

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## PREMIER CAS HUMAIN D'UNE MALADIE OVINE : HÉPATITE NÉCROSANTE MORTELLE A *CLOSTRIDIUM ŒDEMATIENS*

par P. MOLLARET, A.-R. PRÉVOT et M. GUÉNIOT

Nous croyons pouvoir apporter une contribution intéressante au rôle, chez l'Homme, des germes anaérobies en faisant connaître la possibilité d'observer chez ce dernier une maladie antérieurement décrite chez le Mouton : une hépatite nécrosante suraiguë due à *Clostridium œdematiens* (Weinberg et Seguin, 1915), le rôle de ce germe en pathologie humaine, n'étant classiquement admis que dans le domaine des infections gangréneuses d'origine exogène et tellurique.

### RÉSUMÉ CLINIQUE.

Nous ne ferons que rappeler l'essentiel du document clinique, l'observation détaillée du malade faisant, par ailleurs, l'objet d'une présentation à la *Société Médicale des Hôpitaux de Paris* (séance du 9 juillet 1948).

Toute l'histoire du sujet peut être réduite à trois épisodes :

Un épisode très ancien (remontant à 1915) avait consisté en une blessure pariétale gauche ayant obligé à une trépanation ; une hémiplégie droite et une aphasie résiduelle avaient secondairement rétrocedé, au point d'avoir permis au malade d'exercer pendant une trentaine d'années des fonctions actives dans le corps administratif d'un ministère.

Un second épisode, vieux d'un an seulement, avait consisté en un affaiblissement progressif et assez global des facultés intellectuelles, avec perte de l'auto-critique et avec troubles du caractère. La constatation d'une rigidité pupillaire, d'une leucoplasie

commissurale et surtout l'analyse du liquide céphalo-rachidien permirent facilement d'exclure le rôle de l'ancienne blessure et de conclure à une paralysie générale progressive, une encéphalographie gazeuse extériorisant, de surcroît, le substratum atrophique de celle-ci. Ainsi parut indiquée une impaludation thérapeutique, qu'aucune contre-indication ne semblait par ailleurs devoir interdire ; c'est dans ces conditions que le malade fut confié à l'un d'entre nous.

Le dernier épisode, totalement imprévu et d'évolution réellement foudroyante, réalisa, en première approximation, le tableau d'un ictère grave et plus spécialement celui de la soi-disant atrophie jaune aiguë du foie de Rokitsky, le malade mourant dans la nuit même du jour où éclatèrent les premiers symptômes.

Les antécédents syphilitiques du sujet, comme leur retentissement éventuel sur les viscères, étaient certes à retenir soigneusement, mais tout rendait probable le rôle d'une agression surajoutée au niveau du foie puis du rein. Or, rien dans l'histoire récente du sujet ne pouvait être retenu dans ce sens, en particulier aucune intoxication exogène. D'autre part, la ponction lombaire et l'injection gazeuse sous-arachnoïdienne ne comportent jamais de pareilles conséquences hépatiques ; elles remontaient d'ailleurs à une douzaine de jours. Aucun facteur infectieux, enfin, ne pouvait être retrouvé dans l'histoire récente du sujet, comme le soulignait, par chance, la mise en observation qui lui avait été imposée depuis plusieurs semaines. Les circonstances voulaient que l'un d'entre nous, intéressé à cette époque par le problème de l'ultra-virus de l'hépatite infectieuse épidémique, se demandât s'il ne s'agissait point d'une forme foudroyante de cette variété d'hépatite et si le sujet n'était pas entré dans son service précisément à la fin de la longue période d'incubation habituelle de cette infection. Aussi fut-il décidé d'utiliser dans ce sens les prélèvements nécropsiques.

L'autopsie devait permettre les constatations suivantes :

Cadavre présentant une coloration jaunâtre peu intense, mais indiscutable et généralisée, et qui s'affirme plus nette à la face profonde des téguments, au niveau des viscères et, plus particulièrement, au niveau des méninges. A l'ouverture de l'abdomen, les anses intestinales tendent à s'interposer devant le foie, réduisant la surface de projection de celui-ci et expliquant sans doute son apparente diminution de volume. A l'ouverture du thorax, on ne note pas d'anomalie des plèvres, mais une congestion agonique des poumons. On prélève avec le maximum de précautions et sans les ouvrir les différents viscères qui ne présentent comme anomalie qu'un certain degré d'hyperémie. Leurs poids respectifs étaient les suivants :



Foie. . . . .	1.500 g.
Rate. . . . .	190 g.
Cœur. . . . .	450 g.
Poumon droit. . . . .	900 g.
Poumon gauche. . . . .	650 g.
Pancréas. . . . .	130 g.
Rein droit. . . . .	250 g.
Rein gauche. . . . .	50 g.
Surrénale gauche. . . . .	50 g.
Testicule droit. . . . .	30 g.
Testicule gauche. . . . .	90 g.

A noter, incidemment, un contraste extrême entre les deux reins, le droit, volumineux, surmonté d'une surrénale de volume normal, le gauche, tellement petit, que la surrénale correspondante paraissait lui être égale en volume.

On prélève encore le bloc larynx-corps thyroïde et le cerveau ; ce dernier, nettement hyperémié, permet de retrouver sur l'hémisphère gauche les traces de la blessure de 1915.

#### RECHERCHES MICROBIOLOGIQUES.

Les pièces transportées sur-le-champ au laboratoire, le foie est l'objet, avec un luxe de précautions, de prélèvements pour recherches microbiologiques. On est frappé par les inégalités de consistance ; certains territoires, en particulier le lobe gauche, donnent l'impression d'être le siège de petites zones de nécroses molles. Malheureusement, par suite de l'idée préconçue, on décide d'éviter soigneusement de telles zones pour réaliser les prélèvements microbiologiques et histologiques. Ceux-ci sont effectués avec de nouvelles précautions (gants et instruments stériles, organe soigneusement badigeonné de teinture d'iode en surface et placé sur le champ stérile, ouverture réalisée avec un premier jeu d'instruments et prélèvements finalement pratiqués avec un second jeu) ; des fragments sont placés dans le formol et dans le liquide de Bouin ; d'autres font l'objet de cultures aérobies et anaérobies ; d'autres sont placés en récipients stériles préalablement refroidis à 0° et transportés dans la glace fondante à l'Institut Pasteur.

Disons tout de suite que certains fragments, confiés à notre collègue P. Lépine, que nous tenons à remercier, devaient faire l'objet, à son laboratoire, de recherches qui s'avèrent négatives (quand fut connu le résultat de la culture effectuée à partir des fragments) ; mais cette négativité garde son intérêt propre. En effet, après broyage, émulsion en bouillon, centrifugation, filtration du liquide surnageant sur bougie L2, on avait inoculé avec le filtrat dont la culture devait, elle, s'avérer stérile :

Un singe Callitriche mâle (2 cm<sup>3</sup> dans le péritoine).

Deux lapins (1 cm<sup>3</sup> dans le péritoine, 0,2 cm<sup>3</sup> dans le cerveau).

Trois cobayes (1 cm<sup>3</sup> dans le péritoine, 0,05 cm<sup>3</sup> dans le cerveau).

Trois souris ( $0,5\text{ cm}^3$  dans le péritoine,  $0,03\text{ cm}^3$  dans le cerveau).

Dans l'intervalle, en effet, les cultures en milieux anaérobies s'étaient révélées positives ; elles furent alors confiées au Service des anaérobies de l'Institut Pasteur.

Les cultures anaérobies furent ensemencées en gélose profonde en série pour séparation. La morphologie identique de toutes les colonies et leur image microscopique montrèrent une culture pure d'un anaérobie strict, pathogène pour le cobaye, le singe et le lapin. Il s'agissait d'un *Clostridium* typique, de grande taille, faiblement mobile, gazogène, fétide, résistant trente minutes à  $100^\circ$ , très réducteur, à colonies ovatées et arborescentes en gélose profonde, à cultures rapidement auto-agglutinables en bouillon glucosé, liquéfiant lentement la gélatine, coagulant le lait, faisant fermenter glucose, lévulose, maltose, saccharose, galactose et lactose ; produisant  $\text{NH}_3$ , acides acétique, butyrique, lactique et succinique ; formant de l'acétoïne en très grande quantité et un peu d'alcool.

L'injection de  $1\text{ cm}^3$  de culture en bouillon glucosé dans le muscle du cobaye provoque un volumineux œdème gélatineux incolore, extensif, tuant l'animal en vingt-quatre heures.

La toxine apparut à partir du troisième jour en bouillon glucosé. Les souris, injectées par voie sous-cutanée avec  $1/10$ ,  $1/100$  et  $1/1.000$  de  $\text{cm}^3$  de cette toxine, présentèrent le même œdème caractéristique (incolore, gélatineux) et moururent respectivement en sept heures, dix-huit heures et vingt-quatre heures. Cette même toxine filtrée hémolyse au  $1/500$  de  $\text{cm}^3$  les hématies de mouton.

Du point de vue de l'immunologie, la culture totale, la toxine filtrée, l'hémolysine de ce *Clostridium* sont totalement neutralisées par le sérum anti-œdematiens de l'Institut Pasteur, et cela aux doses spécifiques, soit :

1°  $0,25\text{ cm}^3$  administré préventivement empêche toute infection du cobaye par l'injection de  $0,25\text{ cm}^3$  de culture ;

2°  $0,01\text{ cm}^3$  de sérum neutralise 100 DMm de toxine pour la souris, soit  $0,1\text{ cm}^3$  ;

3°  $0,001\text{ cm}^3$  de sérum neutralise 100 doses hémolytiques.

Ainsi, par ses caractères morphologiques, culturels, biochimiques et pathogéniques, l'anaérobie isolé des lésions du malade s'identifie à *Cl. œdematiens*. Il s'agissait du type A.

A noter que le foie des animaux morts après injection de culture de cette souche ne présente pas plus de lésions macroscopiques que ceux des animaux morts après injection de culture de souche de *Cl. œdematiens* provenant de gangrènes toxiques de guerre. La souche de notre malade ne présente donc pas une affinité spéciale pour le tissu hépatique, et si elle s'est fixée sur le foie de ce sujet, c'est pour des raisons inhérentes à ce malade lui-même, et non pour des raisons inhérentes à la souche.



## ETUDE HISTOLOGIQUE.

Cette étude, qui fut secondairement poursuivie avec J. Delarue, fera l'objet d'un mémoire ultérieur avec ce dernier dans les *Annales de Médecine* ; mais nous tenons à le remercier dès main-

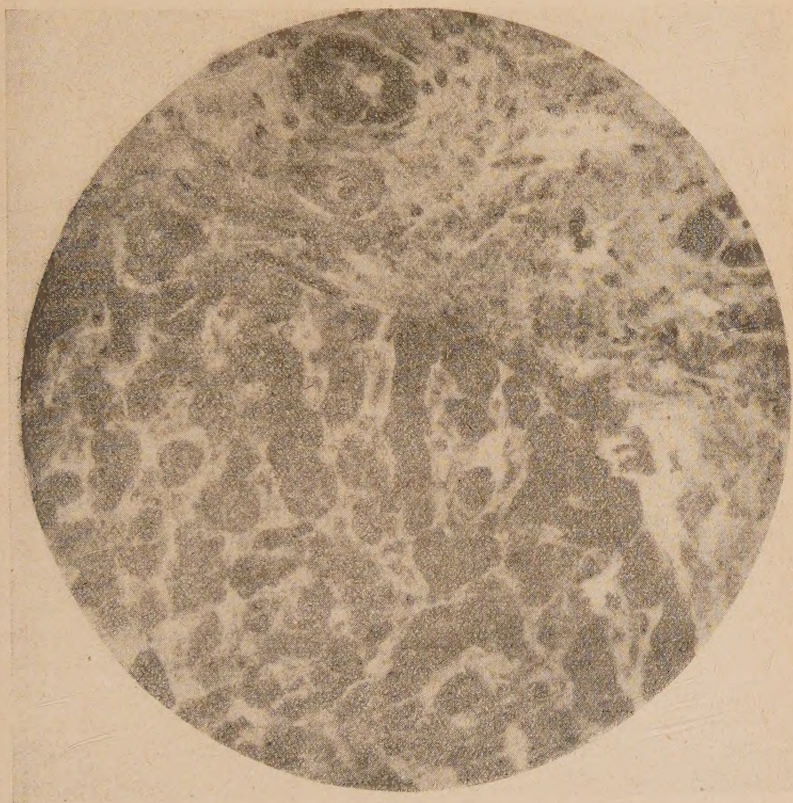


FIG. 1.

tenant, sa confirmation de nos premières constatations nous donnant tout apaisement quant à ces dernières.

Nous ne donnerons ici que le bref résumé suivant :

FOIE. — Les lésions observées sont essentiellement des *lésions nécrosantes de la cellule noble*, ces lésions étant diffuses et d'une intensité sensiblement égale en tous les points des différents fragments examinés.

Alors que les travées hépatiques sont encore reconnaissables et



correctement ordonnées, les cellules qui les composent sont à peine identifiables. Le noyau en a le plus souvent disparu, la pycnose nucléaire cédant nettement le pas à cette caryolyse (fig. 1). Le cytoplasme, avec les colorations usuelles, apparaît homogène, uniformément acidophile ; il est parfois finement grenu.

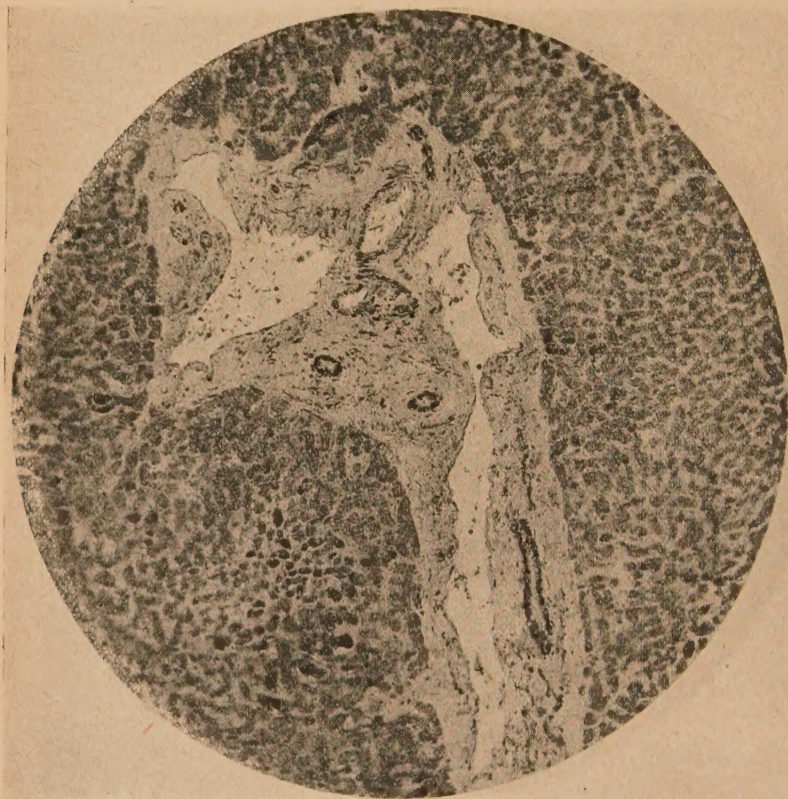


FIG. 2.

Les colorations à l'hématoxyline phosphotungstique de Mallory permettent de mieux préciser cette dégénérescence et cette nécrose du cytoplasme. A noter, dans certaines cellules, de nombreuses petites vacuoles présentant tous les caractères de celles qui révèlent indirectement un certain degré de dégénérescence graisseuse (la coloration élective des graisses n'avait pas été préalablement réservée).

Contrastant avec l'intensité de ces lésions cellulaires élémentaires, il faut souligner la conservation de la disposition architec-



ture du viscère. D'une part, on ne constate pas de lésion en foyers. D'autre part, chaque lobule est aisément identifiable, d'autant que les espaces portes sont rendus particulièrement visibles par une sclérose périportale trabéculaire, dépourvue d'infiltrats inflammatoires, et certainement très ancienne. À ce niveau, canaux biliaires et vaisseaux sont intacts (fig. 2).

A souligner, enfin, que la réticuline des lobules hépatiques,

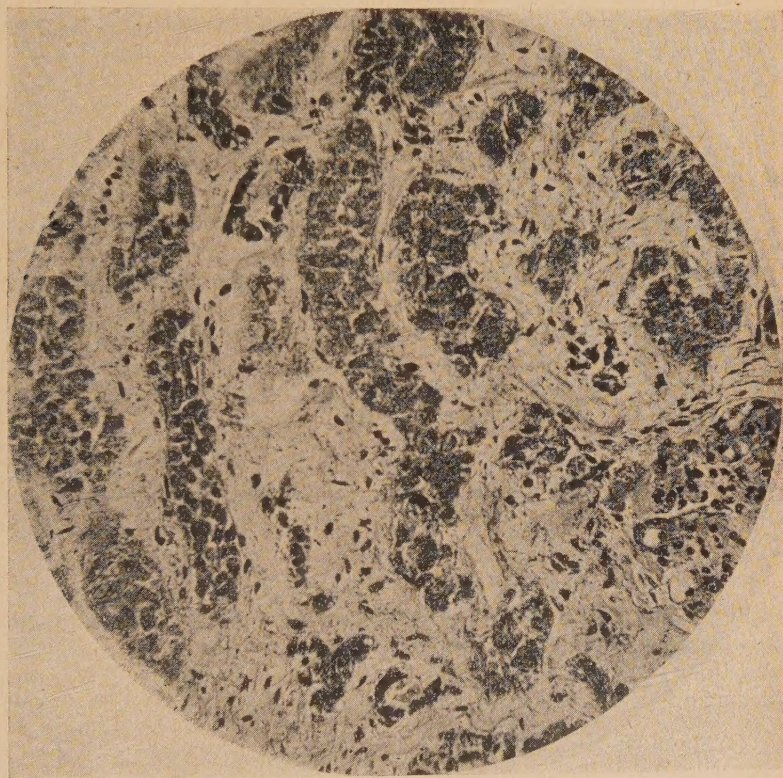


FIG. 3.

mise en évidence par la technique de Laidlaw est également dépourvue d'altérations.

Au total, le foie présente, dans son ensemble, toutes les caractéristiques histologiques d'une hépatite dégénérative parenchymateuse, d'une « hépatose » à la fois massive et suraiguë.

REINS. — Les lésions, comparables au niveau des deux reins, s'apparentent singulièrement aux lésions hépatiques et montrent



le même contraste entre l'intensité de l'atteinte épithéliale et l'intégrité du tissu conjonctif interstitiel et des vaisseaux.

En effet, les lésions intéressent essentiellement les tubes sécréteurs, tubes contournés et pièces intermédiaires, dont il ne reste plus un seul élément intact sur les coupes (fig. 3). Les modifications habituelles consistent en une nécrose avec tuméfaction et homogénéisation du cytoplasme, et avec caryorhexis et pycnose. Les colorations à l'hématoxyline phosphotungstique de Mallory permettent de distinguer différents degrés, correspondant sans doute à autant de stades ; en particulier, quelques tubes (peu nombreux) montrent, comme lésions vraisemblablement initiales, un état granuleux du cytoplasme et un état vacuolaire décapitant le pôle apical de la cellule épithéliale.

Les tubes excréteurs sont fort peu altérés, leur revêtement épithélial est parfois en voie de desquamation.

Les glomérules sont intacts, en dépit des phénomènes congestifs assez marqués dont certains sont le siège.

Le tissu conjonctif interstitiel est normal, ainsi que les axes vasculaires.

Au total, et ici encore, il s'agit d'une lésion massive et dégénérative suraiguë, d'une néphrite épithéliale à allure de « néphrose pure », proche de celle observée dans certaines agressions toxiques suraiguës, telle celle par le sublimé.

RATE. — Elle est, au contraire, remarquablement respectée ; tout s'y réduit à des phénomènes congestifs, mais qui sont très intenses ; la pulpe rouge est gorgée de sang ; la pulpe blanche, bien visible, est normale.

PANCRÉAS. — Le pancréas ne présente pas d'altération, à l'exception d'un faible degré de sclérose interstitielle périlobulaire. Au contraire, les cellules parenchymateuses sont si bien conservées que l'on peut reconnaître des grains de sécrétion dans les acini de certains lobules. Les îlots langerhansiens ne sont pas modifiés.

Nous tenons à mettre dès maintenant l'accent sur cette bonne conservation des tissus spléniques et pancréatiques, car elle donne toute leur valeur aux lésions hépatiques et rénales, écartant le rôle de l'autolyse cadavérique ; une confirmation supplémentaire sera donnée par l'état des testicules.

SURRÉNALES. — Elles présentent des lésions que les constatations précédentes obligent à retenir comme des lésions vraisemblablement intra-vitales. Ces lésions, d'ailleurs parcellaires, consistent en phénomènes d'histolyse de quelques groupes cellulaires de la substance corticale (zone fasciculée surtout).

CORPS THYROÏDE. — Il est peu modifié et présente les caractères morphologiques d'une glande d'adulte âgé.



TESTICULES. — Ils sont remarquablement conservés, au point qu'on peut identifier toutes les lignées cellulaires dans les tubes séminifères et retrouver de nombreux spermatozoïdes ; cette intégrité de la morphologie de la spermatogénèse est une nouvelle garantie de la signification des altérations hépatiques et rénales.

En résumé, tout semble signifier histologiquement une agression toxique suraiguë de la cellule hépatique et, conjointement, de la cellule excrétrice rénale ; le seul fait associé à noter est l'existence d'un certain degré de sclérose périlobulaire ; l'antériorité de celle-ci est évidente, et relève sans doute du terrain syphilitique. Mais il ne saurait être question un seul instant de parler d'hépatite ou de néphrite syphilitique. Hormis ce détail d'une ancienne sclérose, la netteté du processus d'agression toxique apparaît d'une pureté et d'une électivité remarquables. On ne peut pas ne pas y lire à l'évidence la signature de la toxine de *Clostridium œdematiens* libérée au niveau du foie et ayant commencé à s'éliminer au niveau de la partie excrétrice du rein.

#### PATHOLOGIE COMPARÉE.

Cette observation révèle la nécessité d'élargir le domaine classique du rôle pathogène, chez l'Homme, de *Clostridium œdematiens* ; elle établit une symétrie satisfaisante avec ce que l'on connaissait en pathologie vétérinaire.

Chez l'Homme, en effet, les infections à *Cl. œdematiens* restaient enfermées dans le cadre des complications des plaies (plaies de guerre, d'accidents de routes ou du travail, etc.) et se limitaient, au point de vue anatomo-pathologique, aux aspects bien connus de la cellulite et de la myosite œdémateuse gélatineuse : soit de type incolore, quand la souche est très toxique et tue le blessé avant l'apparition de l'hémolyse locale, soit de type rosé, ou même rouge, quand la souche, moins toxique, laisse à l'hémolyse locale le temps de s'extérioriser. Mais, dans tous les cas, il s'agit d'une infection exogène, engendrée par un germe tellurique qui a pénétré par effraction dans l'organisme.

Chez les animaux, on connaissait des faits analogues. Tels sont, chez le Mouton, les gangrènes gazeuses mortelles de la tête ou de l'orbite après blessures par des oiseaux carnassiers (*crow pike*), décrites par Scheuber en Afrique du Sud et par Graham en Australie ; chez le Bélier, les faits de « *swelled head* » ou « *big head* » de Bull, en Australie, sont comparables. Des faits de même signification ont été décrits chez les Bovidés (Kerry-Bosworth et Jordan-Turner), chez le Porc (Gaiger), le Sanglier (von Hibler), le Cheval (Christiansen-Zanolli et Catino), la Poule (De Blicck et Jansen), la Baleine (Kawamura).

Par contre, chez les Ovidés, et avant tout chez le Mouton, on

connaissait l'existence d'une maladie (forme hépatique de la *black disease*) ayant une allure et une signification totalement différentes. Isolée en Australie dès 1876, elle y fut étudiée spécialement par Gilruth (1910), puis par Dodd (1918 à 1921). Il s'agit d'une maladie très rapidement mortelle ; c'est ainsi que, dans un troupeau inspecté l'après-midi et considéré sain, on peut voir apparaître le soir plusieurs cas de mort.

Celle-ci peut être subite. Si la mort est moins rapide, la symptomatologie reste singulièrement réduite ; l'animal tend à rester en arrière du troupeau, puis, une heure ou deux plus tard, prend l'attitude de repos en décubitus sternal ; il y retombe s'il essaie de se relever ; la rumination cesse ; l'animal ne paraît pas souffrir mais se désintéresse de tout ce qui l'entoure ; les efforts du berger et des chiens restent vains ; les mouvements respiratoires deviennent graduellement plus superficiels puis cessent ; le gazon ne porte pas de traces que l'animal se soit débattu ; le cadavre garde le décubitus sternal après la mort jusqu'à ce que la putréfaction gazeuse le fasse chavirer ; la rapidité de décomposition est d'ailleurs un bon argument de diagnostic.

L'autopsie révèle une hépatite nécrosante avec dégénérescence des cellules hépatiques, une congestion de la caillette et du grêle, un exsudat péricardique gélatineux et des suffusions hémorragiques de l'endocarde (surtout au niveau du ventricule gauche).

La nature du processus a été démontrée en 1918 en Nouvelle Galles du Sud par Dodd : c'est une nécrose hépatique secondaire à une intoxication suraiguë par un germe anaérobie. En 1927, Albiston a précisé que ce germe n'était autre que *Cl. oedematiens* ; le fait a été confirmé depuis, la confirmation la plus récente étant celle de Oakley, Wabback et Clark (1947), qui isolent, dans six cas, un *Cl. oedematiens* de type B. Mais, dans cette maladie vétérinaire, l'infection par ce germe est d'ordre endogène (présence de spores dans l'intestin, le foie, la rate). Le mécanisme du déclenchement a été expliqué par Turner, il réside dans le rôle traumatisant des larves de *Fasciola hepatica*, dont le cheminement traumatise le foie. Le même auteur, venu étudier le problème microbiologique de l'affection à l'Institut Pasteur de Paris, avait réalisé la vaccination du cheptel par une anaculture et a ainsi délivré l'Australie de cette redoutable épizootie.

La même affection a été retrouvée en Afrique du Sud et en Europe. En France, en particulier, Carré, Ringard et Debonera (1931) ont signalé trois régions où sévit l'affection. En Roumanie, où elle a été repérée par Cernaianu et Mihailescu, le parasite en cause était *Dicrocoelium lanceolatum*, ce qui ne change rien au mécanisme. L'étude la plus récente (1948) est celle de S. Jamieson, J. J. Thompson et J. B. Brothersten, en Ecosse, dans le Comté de Carthness.



Au total la *black disease* du Mouton, hépatite nécrosante toxique, est engendrée à partir d'une infection endogène à *Cl. œdematiens*. Comme Turner l'a démontré, les pâturages peuvent être infectés par les carcasses d'animaux morts ; un rôle aggravant peut être réalisé par le labourage d'une part, par la surcharge du pâturage en bestiaux d'autre part. Des moutons ingèrent de telles spores et cela sans dommage apparent ; on retrouve ces spores surtout dans le foie et la rate, et elles peuvent subsister là très longtemps (neuf mois dans les expériences de Turner). Cet auteur a constaté qu'il en était ainsi chez 43 p. 100 de moutons apparemment sains, mais paissant dans des pâturages infectés. Dans leur étude récente, S. Jamieson, J. J. Thompson et J. B. Brothersten en Ecosse, font la même constatation chez 5 moutons sur 12 animaux d'apparence normale. Cette tolérance peut subitement prendre fin, à l'occasion du passage de larves parasitaires dont on peut voir la trace au microscope sous forme d'un tunnel rempli de sang extravasé et de débris tissulaires (stade I de Turner). Secondairement se produisent une invasion de polynucléaires et une aréole périphérique de nécrose (stade II). Enfin toute cette zone nécrotique est encerclée par une solide barrière leucocytaire (stade III). C'est dans celle-ci que la coloration de Gram peut montrer des formes végétatives Gram-positives.

Le rôle des larves parasitaires, pour important qu'il soit en pratique, n'est cependant pas *absolument nécessaire* pour qu'éclate la nécrose hépatique foudroyante. Tout ce qui peut permettre l'éclosion brusque des spores est un facteur occasionnel suffisant. C'est ainsi que, dans ses expériences, Turner a pu mettre en évidence l'action déclanchante d'une simple intoxication chimique, en l'occurrence, le tétrachlorure de carbone. Tout ceci doit rester présent à l'esprit pour tenter d'interpréter la physio-pathologie des cas humains.

En effet, la voie d'apport de cet anaérobie au foie de notre malade n'est pas démontrée.

La première hypothèse qui vient à l'esprit est l'ingestion d'un aliment contaminé par *Cl. œdematiens*. L'un de nous a observé une entéro-toxémie mortelle à *W. perfringens* chez une jeune fille qui avait consommé la veille une conserve de veau « faite à la maison » et contaminée par cet anaérobie. Mais, jusqu'à présent, *Cl. œdematiens* n'a jamais été isolé de l'intestin humain ; c'est ainsi que Weinberg, Prévot et Davesne n'ont jamais retrouvé cet agent dans 350 cas d'appendicite aiguë, alors qu'ils ont retrouvé très fréquemment et très facilement tous les autres anaérobies des gangrènes, y compris *Cl. sordellii*.

Pour être complet on pourrait envisager l'hypothèse d'une survie extrêmement longue de spores de cet anaérobie dans le tissu cicatriciel de la plaie de guerre et de la trépanation. Le fait est

indiscutable pour une autre espèce, *Pl. tetani*, et l'on connaît des cas extrêmement tardifs de tétanos secondaire à un léger traumatisme sur le tissu cicatriciel d'une très ancienne blessure. Il faudrait admettre alors le transfert ultérieur de spores dans le foie, en invoquant pour ce faire le rôle des phagocytes. Même dans cette hypothèse, l'hépatite reconnaît finalement une origine endogène.

Le facteur occasionnel susceptible d'avoir présidé, chez notre malade, au développement des spores de *Cl. œdematiens* n'est, de son côté, nullement élucidé. Le rôle de parasites est peu probable, chez l'Homme, mais rien ne pouvait nous laisser prévoir qu'une recherche de ce genre pouvait être indiquée du vivant du sujet ni à l'autopsie. Rappelons que ce rôle n'est nullement indispensable.

Quoi qu'il en soit des lacunes de notre observation, l'agression hépatique par *Cl. œdematiens* ne saurait être mise en doute chez notre malade. Ainsi le domaine des infections dues à cet anaérobie peut être considéré comme susceptible de revêtir une symétrie complète chez l'Homme comme chez les animaux. D'une part, l'infection peut être exogène et succéder à une effraction tégumentaire souillée de terre ; elle évolue alors avec l'allure d'une myosite œdémateuse gélatineuse, rentrant dans le vaste groupe des gangrènes gazeuses. D'autre part, l'infection peut être endogène, secondaire à la pénétration, après ingestion, de spores gagnant le foie et la rate. Qu'une cause occasionnelle (généralement chez le Mouton, le passage de larves parasitaires) engendre le développement de ces spores et une intoxication foudroyante éclate, la toxine de *Cl. œdematiens* entraînant la nécrose suraiguë de la cellule hépatique, puis rénale. Ainsi se révèle, par ailleurs, chez l'Homme une nouvelle étiologie d'ictère grave suraigu et en apparence primitif ; il conviendra dorénavant de le rechercher systématiquement, en se souvenant que *Cl. œdematiens* est un anaérobie strict, si bien que l'isolement de départ peut être facilement manqué.

#### RÉSUMÉ

Première observation, chez l'Homme, d'une hépatite nécrosante suraiguë due à *Clostridium œdematiens* et correspondant, en pathologie vétérinaire, à la forme hépatique de la *black disease* du Mouton.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ALBISTON (H. E.). Infectious necrotic hepatitis of sheep in Victoria. A braxy like sheep disease. *Australian Journal of experimental Biology and medical Science*, 1927, 4, n° 2, 113-123.
- AYNAUD (M.). Présence de larves de nématodes dans les tumeurs du charbon symptomatique et du bradsot. *C. R. Soc. Biol.*, 10 juillet 1926, 95, 440-441.



- BASSET (J.). Hépatite nécrosante infectieuse ou hépato-toxémie. In *Quelques maladies infectieuses*, 1 vol., Vigot, édit., Paris, 1946, 495-501.
- CARRÉ (H.), RINJARD (P.), et DEBONERA (G.). Hépatite nodulaire nécrosante du mouton. *C. R. Soc. Biol.*, 17 octobre 1931, **108**, 387-388.
- CERNAIANU (C.) et MIHAILESCU (M.). Sur l'hépatite infectieuse nécrosante du mouton à *B. œdematiens* en Bessarabie. Immunisation active à l'aide d'anacultures. *C. R. Soc. Biol.*, 28 février 1935, **138**, 1583-1588.
- CURASSON. Hépatite nécrosante infectieuse du mouton au Soudan. *Recueil de Médecine Vétérinaire exotique*, avril-juin 1929, **2**, 65.
- DOOD (S.). The etiology of black disease. *Journal of comparative Pathology and Therapeutics*, 1918, **31**, n° 1, 1-35 ; 1921, **34**, n° 1, 1-26.
- GILRUTH. A disease of sheep in Tasmania. *Veterinary Journal*, mai et juin 1910, **15**, 254-355 ; *Council for Scientific and Industrial Research Bulletin*, 1939, n° 46, 4.
- GRAHAM (E.). On the occurrence of black disease bacilli in the livers of normal sheep. With some observations on the causation of black disease. *Australian Veterinary Journal*, 1928, **4**, n° 4, 133-141 ; The specific identity of the causal organism of black disease in New South Wales. *New South Wales agricultural Dept. scientific Bulletin*, **33**.
- GRAHAM et ROSE. Black disease in sheep. *Agricultural Gazett of New South Wales*, 1929, **40**, 365.
- HELLER (H. H.). (1927), cité in Turner (1930).
- JAMIESON (S.), THOMPSON (J. J.) et BROTHERSTON (J. G.). Studies in black disease. I. The occurrence of the disease in sheep in the North of Scotland. *The Veterinary Record*, 1948, **60**, n° 2, 11-14.
- McEVEN (A. D.). A sporulating anaerobic bacillus, similar to the causal organism of black disease. *Journal of the comparative Pathology and Therapeutics*, 1931, **44**, n° 2, 149-153.
- OAKLEY (C. L.), WABBACK (G. H.) et CLARKE (P. M.). The toxins of *Clostridium œdematiens* (Cl. novyi). *Journal of general Microbiology*, 1947, **1**, n° 1, 91-107.
- TURNER (A. W.). Hépatite infectieuse nécrosante (braxy, black disease) du mouton australien, etc. *Ces Annales*, 1928, **52**, n° 2, 211-224 ; Sur la pathogénie de l'hépatite infectieuse nécrosante (black disease, braxy) du mouton australien. *C. R. Soc. Biol.*, 18 février 1928, **98**, 513-514 ; Le sort des spores de *B. œdematiens* injectées par voie pulmonaire ou intraveineuse, 25 février 1928, **98**, 558-559 ; Infectious necrotic hepatitis (black disease) caused by *B. œdematiens* in a cow. *Australian Veterinary Journal*, 1929, **5**, n° 1, 11-17 ; Black disease of sheep in Australia. *Council for Scientific and Industrial Research Bulletin*, 1930, n° 46, 1-110.
- TURNER (A. W.) et DAVESNE (J.). *B. œdematiens* et « braxy » des moutons de Victoria (Australia). *C. R. Soc. Biol.*, 2 avril 1927, **96**, 921-923 ; Rôle du *B. œdematiens* dans l'étiologie de l'hépa-

tite infectieuse nécrosante (braxy) du mouton australien. Ces *Annales*, 1927, **41**, n° 10, 1078-1906.

WEINBERG (M.), NATIVELLE (R.) et PRÉVOT (A.-R.). *Les microbes anaérobies*, 1 vol. Masson, édit., Paris, 1937, 269-270.



# CONSERVATION DU BACILLE DE CALMETTE ET GUÉRIN (BCG) PAR DESSICCATION APRÈS CONGÉLATION

par SOL ROY ROSENTHAL, M. D.

avec l'aide technique de CAROL CANTRELL et de F. W. PIEPENBROK.

*Laboratoire Tice et Clinique du Sanatorium municipal de Chicago  
et Université de l'Illinois, Collège de Médecine.*

Le vaccin BCG, en suspension dans un milieu de Sauton dilué au 1/4, conserve un degré élevé de vitalité pendant sept jours s'il est gardé à la glacière (10 à 12° C). Au bout de ce temps, la mortalité des bacilles augmente rapidement et, au bout de dix à quatorze jours, elle peut être importante. L'emploi de diluants tels que l'eau physiologique, la glycérine jusqu'à 50 p. 100, augmente la mortalité. Cette brièveté de la vie des bacilles entraîne naturellement des limites à la vaccination. En 1941, avec la coopération de Mudd et Flosdorf, de l'Université de Pennsylvanie, des expériences ont été faites pour dessécher le BCG à l'état congelé (1). La concentration du vaccin varia jusqu'à ce qu'on employât les milieux solides à la pomme de terre ou celui de Sauton. Des véhicules tels que l'eau physiologique, les milieux au lait écrémé, la gélatine à 5 p. 100, le sérum humain normal à 50 p. 100 dilué dans l'eau physiologique n'exercent aucune protection sur le bacille [1]. En 1946, Leshchinskaya [2] publia dans l'*American Review of Soviet Medicine*, un travail d'après lequel l'emploi de glucose à 50 p. 100 comme véhicule avant la dessiccation à l'état congelé, ou avant la dessiccation, permettait de conserver le BCG pendant longtemps. Nous avons refait et confirmé dans son ensemble cette expérience. Nous avons obtenu une bonne culture au bout de dix mois environ. Mais le produit obtenu était adhérent, devenait quelquefois jaune ou brun et si la cristallisation se produisait, on assistait à la stérilisation complète des bacilles. Il était pratiquement impossible de dessécher complètement une suspension de glucose à 50 p. 100 à partir de l'état congelé, surtout si on utilisait des températures inférieures à 38° C pour la dessiccation.

(1) Les suspensions ont été faites à Chicago et envoyées à Philadelphie pour dessiccation et congélation.

Afin d'obtenir un produit qui se dessèche rapidement à un degré d'humidité de 1 p. 100 environ (sans chauffer au-dessus de la température physiologique de 38°), qui puisse être aisément réduit en poudre, qui conserve sa couleur blanc crayeux, d'autres véhicules furent recherchés. Celui qui, jusqu'ici, a donné les meilleurs résultats, est le lactose. Le but du présent travail est de décrire le développement et les résultats de cette nouvelle méthode.

Au cours de nos expériences, nous nous sommes vite rendu compte que les dilutions de lactose, le temps de contact entre bacilles et lactose avant la congélation, la température atteinte au cours du processus de congélation et de dessiccation, la teneur en humidité résiduelle et la conservation à la glacière, influuaient sur la survie des bactéries. Ces facteurs seront discutés plus loin.

### VIABILITÉ.

La survie des bacilles est déterminée par culture et par inoculation à l'animal. Des recherches comparatives sont toujours faites avec du vaccin frais non traité (15 mg. par centimètre cube).

**A. CULTURE.** — On utilise du milieu de Löwenstein à l'œuf, dans des flacons pharmaceutiques de 1 once (31,103 g.) avec des bouchons vissés. Le matériel qu'on ajoute est mis en suspension dans de l'eau distillée qu'on ajoute jusqu'à compléter le volume originel. On n'utilisera que les échantillons qui se remettent rapidement et complètement en suspension. Les suspensions contiennent une moyenne de 25 mg. par centimètre cube d'humidité (poids humide).

Ces suspensions sont diluées dans un milieu de Sauton dilué au 1/4, comme suit : 1:100, 1:1.000, 1:10.000. On ensemence chacune des dilutions avec 0,2 cm<sup>3</sup> de vaccin concentré. Les flacons sont mis à l'étuve à 37° sur leur côté plat, le bouchon n'étant pas complètement vissé. On lit le résultat des cultures toutes les semaines pendant un minimum de six semaines. Au bout de ce temps, si les cultures restent stationnaires pendant deux semaines, elles sont rejetées. Une culture 4+ est celle dans laquelle se forme une couche feutrée de colonies étroitement accolées qui ne présentent nullement la couleur verte du milieu. La graduation va en diminuant jusqu'à 1+ où on compte de nombreuses petites colonies. Si les colonies peuvent être dénombrées, on note leur nombre. On obtient des cultures 3+ à 4+, 1+ à 2+, 1+ et enfin des colonies qu'on peut dénombrer avec des taux respectifs de vaccin non traité concentré et les dilutions 1:100, 1:1.000 et 1:10.000.

**B. INOCULATION A L'ANIMAL.** — Des cobayes sont inoculés avec des suspensions de bacilles pour étudier la rapidité du virage



de la réaction à la tuberculine. On fait 1 à 60 piqûres dans la région lombaire, près de la colonne vertébrale. On fait également des inoculations intrapéritonéales de 10 à 20 mg. des bacilles remis en suspension pour éprouver leur virulence. Les épreuves à la tuberculine sont faites avec 10 mg. de tuberculine O. T., d'abord toutes les semaines, puis tous les mois.

**TECHNIQUE DE DESSICCATION APRÈS CONGÉLATION.** — En général, les suspensions de bacilles à la concentration et dans le milieu désiré sont répartis dans des flacons de 15 cm<sup>3</sup> (2 cm<sup>3</sup>), des ampoules de 5 cm<sup>3</sup> (1 cm<sup>3</sup>), ou dans des tubes capillaires (hauteur de la colonne : 1 cm). Les suspensions sont alors congelées au groupe frigorifique (—45° C), ou par un mélange d'alcool et de glace carbonique (—72° C), ou dans la neige carbonique en poudre (pour les tubes capillaires seulement). Les flacons de verre sont soumis à la rotation (congélation en couches circulaires périphériques) ou non (congélation en masse); ensuite ils sont placés dans des récipients en métal réfrigérés par la glace, et on met le tout à la glacière pendant une heure au moins. On emploie un appareil de Strumia pendant tout le processus de la congélation et de la dessiccation sous vide. Le temps nécessaire à la dessiccation est de vingt-quatre à soixante-douze heures. Puis on introduit de l'azote sec dans la chambre à vide, interrompant ainsi le vide. L'appareil de Strumia sert généralement au plasma et convient moins à la dessiccation du BCG, mais c'est le seul appareil dont nous disposions.

**A. DILUTION DU LACTOSE.** — La solubilité du lactose est environ 20 g. pour 100 cm<sup>3</sup> d'eau. Dans une expérience, différents poids de lactose dans des flacons de 15 cm<sup>3</sup> sont autoclavés; puis on ajoute les suspensions de bacilles (2) de telle sorte que la teneur en lactose soit de 10, 15, 20 et 50 p. 100. On compare avec du glucose à 50 p. 100. Les résultats sont rapportés dans le tableau I ci-après.

De ces expériences, on a conclu que le lactose à la concentration de 15 p. 100 était le milieu de choix en ce qui concerne la solubilité, le produit final, etc.

**B. TEMPS DE CONTACT AVEC LE LACTOSE.** — On a remarqué que le temps de contact avec le lactose, avant la congélation influençait le pourcentage des survies. Pour déterminer ce temps de contact, on a fait des suspensions de la façon habituelle, et à des intervalles de une, trois, cinq, vingt-quatre, trente et quarante-huit heures, des échantillons ont été prélevés et congelés. Tous ont été conser-

(2) Cette façon d'ajouter le lactose s'est révélée la plus satisfaisante.

TABLEAU I.

NUMÉRO de la culture	VÉHICULE	CROISSANCE maximum du vaccin concentré	TEMPS minimum
816 L. . . . .	50 p. 100 glucose.	1 +	5 semaines.
	50 p. 100 lactose.	—	6 semaines.
	20 p. 100 lactose.	2 +	2 semaines.
818 L. . . . .	50 p. 100 glucose.	4 +	6 semaines.
	10 p. 100 lactose.	3 +	4 semaines.
	20 p. 100 lactose.	4 +	3 semaines.
812 L. . . . .	20 p. 100 lactose.	2 +	4 semaines.
	15 p. 100 lactose.	2 +	4 semaines.
	10 p. 100 lactose.	2 +	4 semaines.
812 H. . . . .	20 p. 100 lactose.	3 +	5 semaines.
	15 p. 100 lactose.	4 +	3 semaines.

vés à basse température ( $-30^{\circ}$  C) de façon à pouvoir être tous desséchés en même temps. Le tableau II expose les résultats.

TABLEAU II. — Temps de contact avec le lactose avant congélation

CROISSANCE MAXIMUM	TEMPS DE CONTACT					
	1 h.	3 h.	5 h.	24 h.	30 h.	48 h.
2 + ou moins (Nombre). . . . .	9	5	4	8	7	6
3 + ou 4 + (Nombre). . . . .	2	7	11	6	1	1
Total (67) . . . . .	11	12	15	14	8	7

Dans 67 déterminations, le temps de contact optimum s'est montré être de cinq heures. Un temps de contact de trois à vingt-quatre heures donnait des résultats acceptables. On a remarqué qu'il était essentiel d'agiter toutes les heures et que les meilleurs résultats étaient obtenus en effectuant les concentrations dans de grands flacons et en répartissant ensuite dans de plus petits après seulement que le temps de contact désiré avec le lactose ait été réalisé.

C. TEMPÉRATURE ATTEINTE AU COURS DU PROCESSUS DE DESSICCATION. — On a montré, pour la dessiccation du plasma par sublimation avec de la glace que, pendant la période principale de dessiccation au cours de laquelle 90 p. 100 de l'humidité sont éliminés, la température du plasma doit être maintenue à  $-15^{\circ}$  C.



ou plus bas. Puis on laisse la température remonter lentement et graduellement (35 à 40° C : période intermédiaire de dessiccation). Si la température s'élève trop alors qu'il y a encore de l'humidité, la dénaturation du plasma se produit. Mais si le plasma est d'abord complètement desséché jusqu'à une teneur finale de 0,5 p. 100 d'humidité, les températures élevées ont moins de chance de le dénaturer.

A cause des limites imposées par l'appareil, on ne peut connaître que les températures de la vapeur d'eau, et celles-ci sont enregistrées automatiquement sur un graphique. Le thermo-couple se trouve dans la chambre de dessiccation. Cette température est beaucoup plus élevée que la température du matériel congelé. On sait qu'à une pression de 4,6 mm. de mercure, l'eau gèle. Dans nos expériences, la température de la chambre à dessiccation a été maintenue de —5 à —10° C jusqu'à ce qu'on atteigne 0,1 mm., ce qui assure un produit congelé. On laisse remonter graduellement la température quand le vide désiré a été atteint. Dans 28 expériences séparées dans lesquelles les températures maxima atteignirent 20 à 29° C dans les premières vingt-quatre à soixante-douze heures, 8 expériences sur 18 donnèrent une croissance 4+ après le traitement. D'autre part, avec des températures maxima de 34 à 38°, 6 expériences sur 7 donnèrent une culture 4+. La teneur en humidité était environ 1 p. 100 dans le cas de dessiccation pendant vingt-quatre heures. Elle était un peu inférieure dans le cas de dessiccation pendant soixante-douze heures, mais ceci n'a pas été considéré comme essentiel. Les conditions optima consistent à maintenir la température de la vapeur d'eau au-dessous de 5° C jusqu'à ce qu'on atteigne 0,1 mm. ou moins de pression. On doit alors laisser la température remonter graduellement jusqu'à ce qu'elle atteigne 30° en six à huit heures et 34° en douze, vingt et vingt-quatre heures.

#### DURÉE DE LA VIABILITÉ.

Etant donné que la technique a continuellement changé en ce qui concerne le pourcentage du lactose, le temps de contact avec le sucre, la température, la fermeture des récipients par des bouchons de verre ou de caoutchouc, etc., il est difficile d'évaluer exactement la durée de la viabilité et le pourcentage de morts après dessiccation à l'état congelé. Dans les premières expériences, surtout quand on employait des bouchons de caoutchouc, la teneur en humidité du matériel conservé s'élevait à près de 8 p. 100. Dans les premières expériences également, les températures ne dépassaient pas 29° C. Néanmoins, des développements 3+ ont été obtenus après six ou sept mois de conservation pour bon nombre d'échantillons. Dans les expériences plus

récentes, en particulier quand on atteignait des températures de 34 à 38° C, on a obtenu des développements de 4 + pour le vaccin concentré, et aussi une culture dans les dilutions à 1 : 10.000, et la durée de ces expériences est maintenant de deux mois.

Les résultats ci-dessus ont été obtenus avec des échantillons conservés à la glacière. Au début, quand on employait des bouchons de caoutchouc, la durée de viabilité était courte. Quand on employa de l'azote sec au lieu d'air pour interrompre le vide et quand on scella les ampoules, des développements de 4 + ont été obtenus deux mois après la dessiccation (expériences en cours).

Dans les conditions de la première partie de cette expérience, une bonne viabilité s'observait sept mois après la dessiccation. En améliorant cette technique (par l'emploi de températures plus élevées, en scellant les ampoules ou les capillaires, en rompant le vide avec de l'azote sec) on a obtenu un degré de viabilité bien plus élevé.

Ce produit remplit les conditions exigées du vaccin non traité, c'est-à-dire un développement de 3 + à 4 + sur milieu de Löwenstein pour le vaccin concentré, et quelques colonies ou de nombreuses colonies pour la dilution à 1 : 10.000. Avec les tubes capillaires, un degré élevé de viabilité est atteint quand le vaccin est conservé à la température du laboratoire pendant deux mois au moins (expériences en cours).

#### ETUDES SUR L'ANIMAL.

Des recherches ayant pour but de déterminer la virulence et la rapidité du virage de la réaction à la tuberculine ont été effectuées avec tous les échantillons ayant donné une bonne culture. Généralement, on y procédait trois semaines après le traitement et tous les deux mois ensuite.

A. ETUDE DE LA VIRULENCE. — Les animaux sont inoculés par voie intrapéritonéale avec 10 à 20 mg. de vaccin remis en suspension, ou par la méthode des piqûres multiples au moyen de 60 piqûres. Sur 99 animaux inoculés par toutes ces méthodes, on n'a pu mettre en évidence aucune lésion progressive deux à dix mois après l'inoculation. Les lésions produites étaient semblables à celles causées par les vaccins frais et ont été décrites ailleurs [3].

B. VIRAGE DE LA RÉACTION A LA TUBERCULINE. — Chez 73 animaux inoculés par la méthode des piqûres multiples, la réaction à la tuberculine devint positive dans tous les cas. A la fin de la première semaine, plus de 50 p. 100 étaient devenues positives, au bout de deux semaines environ 90 p. 100, et au bout d'un



mois 100 p. 100. Tous les animaux, dix mois après la vaccination, réagissaient positivement à 10 mg. de tuberculine O. T. Le vaccin âgé de six mois, conservé à la glacière ou à la température du laboratoire (tubes capillaires) remplissait les conditions exigées du vaccin non traité, c'est-à-dire que chez le cobaye de 400 à 500 g. une piqûre à travers le vaccin concentré donnait une réaction positive à 10 mg. de tuberculine O. T. une semaine après la vaccination chez au moins 50 p. 100 des animaux [4]. Les animaux doivent reprendre du poids pendant cette période.

Dans un essai récent [5] sur l'homme, dans lequel 270 individus furent vaccinés avec du BCG congelé et desséché, comparativement à 189 sujets vaccinés avec des bacilles non traités, les résultats se comparent favorablement en ce qui concerne la production des lésions locales.

### RÉSUMÉ.

L'auteur décrit une méthode de conservation du vaccin BCG, qui permet d'obtenir un produit blanc à l'état de poudre, facile à remettre en suspension, stable, et qui contient environ 1 p. 100 d'humidité. La viabilité est plus grande que celle du vaccin frais, puisque le vaccin traité reste vivant pendant au moins sept mois (expériences en cours). Le vaccin sec en ampoules scellées peut être conservé à la température du laboratoire. Le virage de la réaction à la tuberculine chez le cobaye et la production des lésions locales chez l'homme à la suite de vaccination avec le vaccin sec se comparent favorablement avec les résultats obtenus avec le vaccin non traité.

La meilleure technique qui ait été élaborée jusqu'à présent est la suivante :

1° Employer des cultures de quatorze jours sur milieu de Sauton.

2° Mettre en suspension 30 mg. par centimètre cube (poids humide) dans du lactose à 15 p. 100 chimiquement pur (3).

3° Laisser en contact avec le véhicule pendant au moins trois heures et au plus vingt-quatre heures ; optimum : cinq heures. Agiter fréquemment pendant cette période.

4° Répartir, à raison de 1 cm<sup>3</sup>, dans des ampoules de 5 cm<sup>3</sup> et congeler fortement, les ampoules étant inclinées à 30° dans un

(3) Si le lactose est ajouté en solution, il doit être mis en suspension dans de l'eau seulement. Une seconde méthode consiste à stériliser la poudre de lactose dans un flacon et ajouter une suspension du vaccin qui aura été faite dans un milieu de Sauton à 25 p. 100. Dans ce dernier cas, la poudre desséchée ne doit être employée que remise en suspension et non comme poudre prête à la vaccination.

mélange de glace carbonique et d'alcool ayant la consistance du fromage blanc. Les ampoules doivent être entièrement recouvertes par ce mélange.

5° a) Continuer à refroidir dans des récipients de métal refroidis au préalable et conserver à la glacière pendant un minimum d'une heure. Placer rapidement les récipients avec les ampoules dans une chambre à vide et obtenir une pression de 100  $\mu$  au moins en quelques minutes.

5° b) Si l'on fait le vide dans chaque ampoule individuellement, conserver dans un mélange de glace carbonique et d'alcool jusqu'à ce qu'on obtienne un vide de 100  $\mu$ .

6° Maintenir la température de la vapeur d'eau à  $-5^{\circ}$  au moins jusqu'à ce qu'on atteigne le vide.

7° Chauffer graduellement de façon que la température de la vapeur d'eau atteigne  $30^{\circ}$  au bout de six à huit heures et  $34^{\circ}$ - $36^{\circ}$  au bout de douze à vingt-quatre heures.

8° Interrompre le vide avec de l'azote.

9° a) Sceller les ampoules immédiatement.

9° b) Si l'on dessèche les ampoules individuellement, sceller sous vide.

10° La conservation idéale se ferait à la glacière ( $10$ - $12^{\circ}$ ), mais elle peut se faire à la température du laboratoire si c'est nécessaire.

#### BIBLIOGRAPHIE

[1] Expériences non publiées.

[2] LESHCHINSKAYA (E. N.). *Am. Rev. Soviet. Med.*, 1946, **3**, 210.

[3] ROSENTHAL (Sol Roy). *The general tissue and humoral response to an avirulent tubercle bacillus*. University of Illinois Press, Urbana, 1938.

[4] ROSENTHAL (Sol Roy). *Ces Annales*, 1948, **75**, 209.

[5] ROSENTHAL (Sol Roy). *Ces Annales*, 1948, **75** (sous presse).

[6] LEVINSON (S. O.), OPPENHEIMER (F.). *Drying by ice sublimation*. Samuel Deutsch Serum Center, Michael Reese Research Foundation. (Contract OEM-cmr-132) Office of Scientific Research and Development, Washington, D. C.



**COMPARAISON**  
**DES SPECTRES D'ABSORPTION DES ÉCRANS**  
**ET DES SPECTRES D'ABSORPTION**  
**ET D'ÉMISSION DES FLUOROCHROMES**  
**AU COURS DE LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE**

par JEAN-C. LEVADITI, R.-O. PRUDHOMME et J. AUGIER (\*).

(*Institut Pasteur.*)

Au cours de la microscopie en fluorescence, la visibilité des microorganismes [1] ou des virus [2] rendus fluorescents par les fluorochromes dépend de la façon dont sont combinées quatre variables : le spectre d'absorption de l'écran destiné à sélectionner la lumière excitatrice, le spectre d'absorption du fluorochrome, son spectre de fluorescence et enfin le spectre d'absorption du filtre d'arrêt qui surmonte l'oculaire et qui est destiné à neutraliser le rayonnement de la lumière excitatrice, tout en transmettant le rayonnement secondaire émis par l'objet.

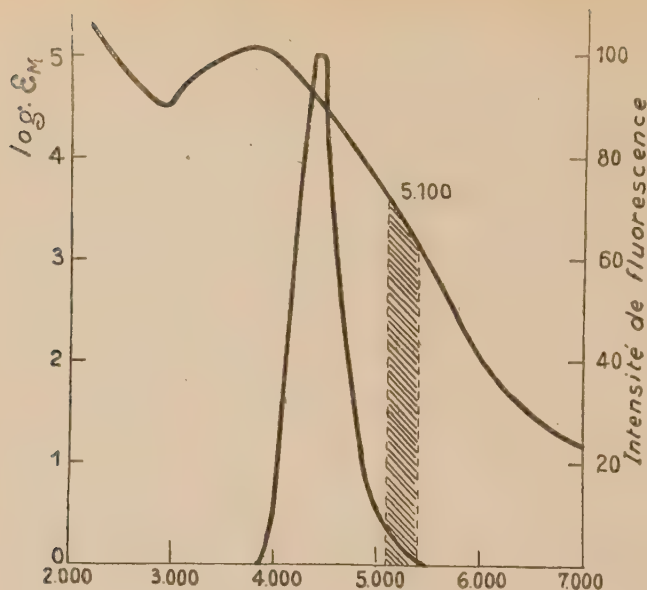
Pour préciser les conditions actuelles de visibilité de la microscopie en fluorescence, nous avons étudié successivement les courbes d'absorption et de fluorescence des fluorochromes ainsi que les courbes d'absorption des différents écrans [3].

**I. — COURBES D'ABSORPTION ET D'ÉMISSION DES FLUOROCHROMES.**

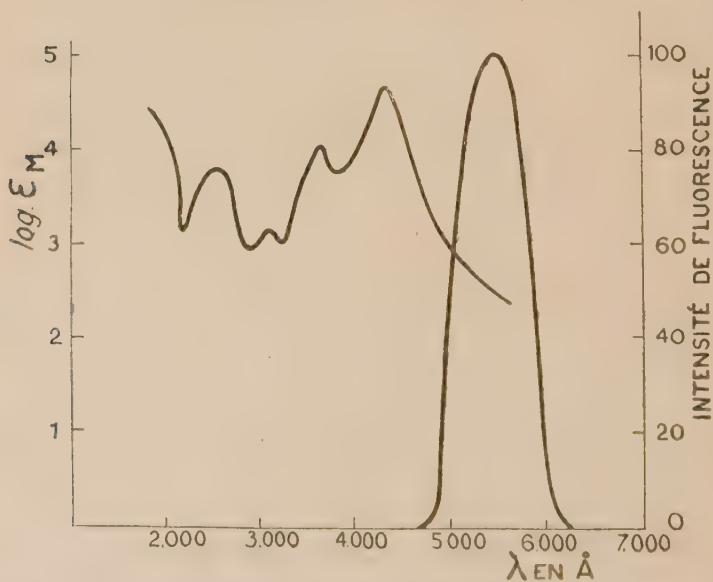
Parmi les multiples fluorochromes, seules la Thioflavine S et l'Auramine O ont été étudiées, car ces deux substances donnent des résultats de beaucoup supérieurs à ceux obtenus avec les autres fluorochromes.

Les spectres d'absorption et de fluorescence de la Thioflavine S sont indiqués sur la courbe 1. Ils ont été étudiés en France par Giuntini et Reinié [4] et nos résultats confirment les leurs [5]. Le maximum d'absorption (courbe 1) répond à la longueur d'onde  $\lambda = 3.800 \text{ \AA}$  et le spectre de fluorescence a son maximum à  $5.100 \text{ \AA}$ , les longueurs d'ondes extrêmes du spectre de fluorescence sont :  $3.900$  et  $5.400 \text{ \AA}$ .

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1<sup>er</sup> juillet 1948.

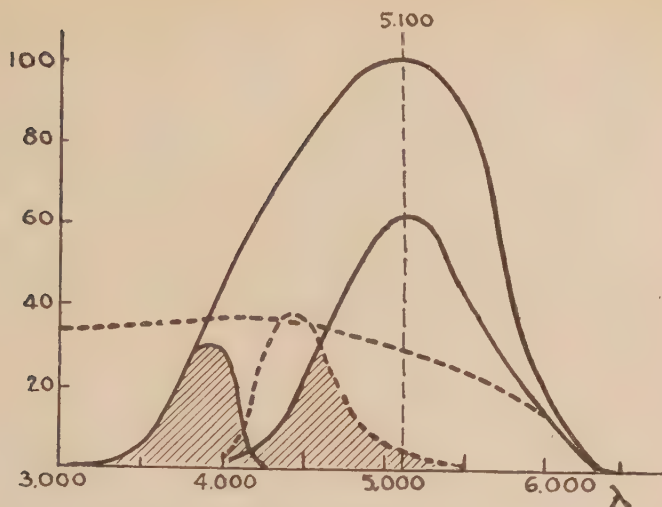


Courbe 1. — Courbes d'absorption et de fluorescence de la Thioflavine S en solution aqueuse  $\log \epsilon$  moléculaire.

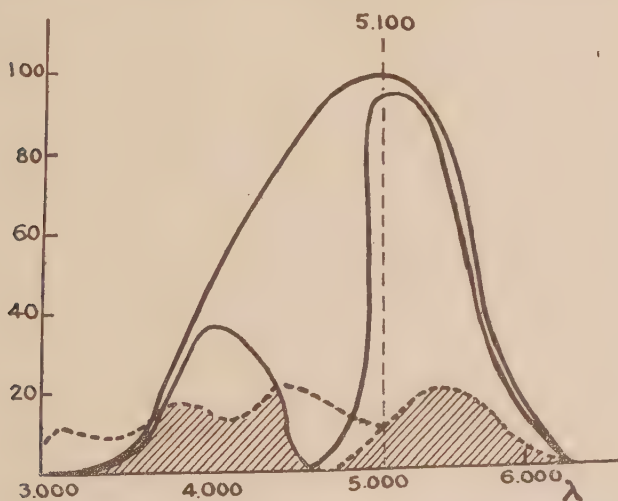


Courbe 2. — Courbes d'absorption de l'Auramine O en solution aqueuse  $\log \epsilon$  moléculaire et courbe de fluorescence de ce corps adsorbé au préalable sur une couche de *M. tuberculosis* (souche B. C. G.).





COURBE 3. — Courbes de répartition spectrale énergétique de la lumière de l'arc après passage à travers la cuve de  $\text{SO}_4\text{Cu}$ , l'écran UG1 et le filtre d'arrêt jaune fumé surmontant l'oculaire. En pointillé les courbes d'absorption et de fluorescence de la Thioflavine.



COURBE 4. — Courbes de répartition spectrale énergétique de la lumière de l'arc après passage à travers la cuve de  $\text{SO}_4\text{Cu}$ , l'écran B. 93 et le filtre d'arrêt G.G. 3 surmontant l'oculaire. En pointillé les courbes d'absorption et de fluorescence de l'Auramine.

Les spectres d'absorption et de fluorescence de l'Auramine (courbe 2) ont déjà été établis par Keller [6]. Un premier maximum d'absorption répond à  $3.600 \text{ \AA}$  et un second maximum, de longueur d'onde plus grande, est situé à  $4.500 \text{ \AA}$ . Le spectre de fluorescence a son maximum pour  $\lambda = 5.450 \text{ \AA}$  et ses longueurs d'ondes extrêmes sont respectivement  $4.700$  et  $6.200 \text{ \AA}$ .

Mais il faut remarquer que l'Auramine en solution aqueuse paraît dépourvue de toute fluorescence [7]. C'est pourquoi nous avons étudié le spectre d'émission de ce corps après l'avoir adsorbé d'une part sur du papier filtre et, d'autre part, sur une couche de *Mycobacterium tuberculosis* (souche BCG) soumise ensuite à la dessiccation.

## II. — COURBES D'ABSORPTION DES ÉCRANS DE VERRE.

L'écran placé avant l'objet sélectionne la lumière excitatrice : il doit donc transmettre les longueurs d'ondes correspondant à la bande d'absorption qui excite la fluorescence du fluorochrome. Le filtre d'arrêt qui surmonte l'oculaire doit neutraliser complètement la lumière transmise par le premier écran tout en transmettant le rayonnement secondaire émis par le fluorochrome.

Chaque écran destiné à sélectionner la lumière excitatrice doit donc être combiné avec un filtre d'arrêt et le rayonnement que transmettent ces écrans ne doit avoir aucune longueur d'onde commune.

Parmi les nombreux écrans existants, deux combinaisons munies chacune d'un écran sélecteur et d'un filtre d'arrêt ont été seules retenues ; les autres écrans, ou sont inutilisables, comme le démontre le simple examen microscopique, ou font double emploi avec les combinaisons étudiées, leurs spectres d'absorption étant sensiblement identiques.

Enfin, les courbes d'absorption des écrans doivent être corrigées suivant la courbe de répartition spectrale énergétique de la source lumineuse qui, pour le microscope d'Haitinger, est un arc au charbon dont le rayonnement traverse une solution de  $\text{SO}_4\text{Cu}$  et pour le microscope de Reichert, une lampe ponctuelle à filament de tungsten (Lux G). Seules les courbes ainsi corrigées sont exposées car elles seules interviennent dans la pratique.

*Première combinaison d'écrans.* — Ecran UG1 et filtre d'arrêt jaune fumé de Zeiss (courbe 3). Le maximum de transmission de l'écran UG1 est de 75 p. 100 à  $3.600 \text{ \AA}$  et les longueurs d'ondes extrêmes sont  $2.900$  et  $4.100 \text{ \AA}$ . Le maximum de transmission du filtre d'arrêt placé au-dessus de l'oculaire du microscope répond à la longueur d'onde  $5.150 \text{ \AA}$ , longueurs d'ondes



extrêmes 4.000 et 6.500 Å. Ce filtre d'arrêt éteint mal le fond car il laisse passer un peu de violet transmis par l'écran UG1.

*Deuxième combinaison d'écrans.* — Ecrans B.93 et GG3 de Zeiss (courbe IV). Le maximum de la lumière transmise par l'écran B.93 est de 80 p. 100 à 4.000 Å et les longueurs d'ondes extrêmes sont 3.000 et 4.600 Å. Le maximum de transmission du filtre d'arrêt GG3 est de 95 p. 100 pour la longueur d'onde 5.150 Å et les longueurs d'ondes extrêmes sont 4.700 Å et 6.300 Å. Avec cette combinaison le fond est mieux neutralisé, ce qui s'explique par le fait que les deux spectres sont séparés par une centaine d'Å (4.600 à 4.700 Å).

#### DISCUSSION.

Ce sont les concordances ou les discordances de chacune de ces combinaisons d'écrans avec les courbes d'absorption et de fluorescence des fluorochromes qui conditionnent leur efficacité. Pour réaliser cette comparaison, nous avons reporté les courbes d'absorption et de fluorescence des fluorochromes sur les courbes d'absorption des combinaisons d'écrans.

Sur la courbe d'absorption de la première combinaison d'écrans, nous avons reporté les courbes d'absorption et de fluorescence de la Thioflavine (courbe 3); sur celle de la seconde combinaison, nous avons reporté celles de l'Auramine. Afin de ne pas multiplier les courbes, nous n'avons pas exposé les combinaisons inverses faciles à réaliser.

Il résulte de l'examen de la courbe 3 qu'une grande partie de la courbe d'absorption de la Thioflavine est utilisée par l'écran UG1 et que la courbe de fluorescence de ce corps est située en grande partie en dehors du spectre de transmission du filtre d'arrêt. La courbe 4 indique qu'une partie seulement des deux maxima de la courbe d'absorption de l'Auramine est utilisée par l'écran B.93 et que le spectre d'émission de ce fluorochrome est transmis en totalité par le filtre d'arrêt GG3.

Etant donné que, dans la pratique, la première combinaison d'écrans permet de distinguer les objets rendus fluorescents par l'Auramine et que seul le premier maximum d'absorption de ce fluorochrome (longueur d'onde 3.660 Å) est compris dans le spectre de l'écran UG1 alors que le second maximum (longueur d'onde 4.500 Å) est situé en dehors de lui, c'est bien la bande située au voisinage de 3.660 Å qui contribue principalement à la fluorescence, le second maximum n'y contribuant que pour une faible part.

Les écrans de verre existants sont donc loin d'être parfaits.

tement adaptés à l'examen en fluorescence, c'est pourquoi l'un de nous étudie, dans la note suivante, la possibilité d'écrans liquides plus maniables et plus sélectifs.

#### CONCLUSION.

L'étude spectrographique des écrans colorés qu'utilise la microscopie en fluorescence ainsi que la connaissance précise des spectres d'absorption et d'émission des fluorochromes démontrent que les conditions pratiques de visibilité actuelles sont loin de concorder avec les données théoriques qui donneraient à cette technique son maximum d'efficacité.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HAGEMAN (P.). *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1937, **63**, 514, et *Münch. med. Wochenschr.*, 1937, **20**, 671.
- [2] LEVADITI (C.), REINIÉ (L.) et BÉQUIGNON (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 704 et LEVADITI (C.) et collab. *Ces Annales*, 1940, **64**, 359 et 466.
- [3] LEVADITI (Jean C.), PRUDHOMME (R. O.) et AUGIER (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 217.
- [4] GIUNTINI (J.) et REINIÉ (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 633.
- [5] LEVADITI (J. C.) et PRUDHOMME (R. O.). *Ces Annales*, 1945, **71**, 422.
- [6] KELLER (J.). *Münch. med. Wochenschr.*, 1938, **52**, 2.024.
- [7] Cette question fait l'objet, de la part de l'un de nous (R. O. Prudhomme), d'une étude systématique.

# ÉCRANS LIQUIDES ADAPTES A LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE UTILISANT L'AURAMINE COMME FLUOROCROME

par J. AUGIER et R.-O. PRUDHOMME.

(Institut Pasteur.)

Dans le mémoire précédent (1) nous avons précisé les conditions qui doivent être satisfaites pour avoir une bonne visibilité des microorganismes observés au microscope à fluorescence. Il faut :

1° Que le spectre d'absorption du filtre laissant passer la lumière excitatrice ait une bonne transmission là où le fluorochrome présente un ou plusieurs maxima d'absorption.

2° Que le filtre d'arrêt ne laisse passer que la lumière de fluorescence tout en éliminant la totalité de la lumière excitatrice.

Les filtres B93 et GG3 de Zeiss ne donnent pas une solution parfaite ; le fond n'est pas absolument noir parce que la transmission pour  $\lambda = 4650 \text{ \AA}$  n'est pas absolument nulle, surtout avec la lumière de l'arc.

En 1937-1938, Hagmann (2) et Keller (3) ont proposé une solution qui donne une approximation suffisante. Ils utilisent des filtres de verre et une source lumineuse constituée par une lampe ponctuelle à filament de tungstène 6v. 5A (Lux G). Le filtre qui sélectionne la lumière excitatrice est composé de 2 verres bleus *Reichert 61* de 2 mm. d'épaisseur et le filtre d'arrêt est un filtre *Reichert 32* de 2 mm. d'épaisseur. Ces filtres donnent un bon résultat : le fond est suffisamment obscur, la fluorescence bien visible.

Nous avons cependant cherché à obtenir un résultat meilleur à l'aide d'écrans *liquides* qui présentent l'avantage d'être beaucoup plus facilement adaptables que les filtres de verre, à l'usage d'un fluorochrome donné. Avec un autre fluorochrome, les filtres doivent être légèrement modifiés (ces modifications feront l'objet d'une note ultérieure).

Les Américains (4) ont déjà montré que le sulfate de cuivre ammoniacal pouvait convenir. Il nous restait à trouver la substance adéquate pour le filtre d'arrêt, ainsi que des cuves pratiques et faciles à réaliser. Voici ce que nous proposons :

(1) J. LEVADITI, R.-O. PRUDHOMME et J. AUGIER, *Ces Annales*, 1948, **75**, 217.

(2) P. HAGMANN, *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1937, **63**, 514 ; *Münch. med. Wochenschr.*, 1937, **20**, 671.

(3) J. KELLER, *Münch. med. Wochenschr.*, 1938, **52**, 2024.

(4) GRAHAM, *Am. Rev. Tub.*, 1943, **48**, 421.



**FILTRE BLEU.** — Dissoudre dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée bouillie chaude 20 g. de sulfate de cuivre R. P. ; y ajouter 30 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque titrant exactement 9,5 N. Il se forme un précipité qui se redissout presque complètement. Agiter de temps à autre et laisser au repos toute la nuit. Filtrer le précipité. Prendre 13 cm<sup>3</sup> du filtrat et y ajouter 2 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque concentré. Cette solution, mise dans une cuve en plexiglass de 5 mm. d'épaisseur donne un écran que nous appelons C. N. C. 5. Si on ajoute 2 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque dilué au 1/10 au lieu de 2 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque concentré, on a un filtre que nous appelons C. N. D. 5. L'un ou l'autre de ces écrans est placé devant la lampe.

**FILTRES JAUNES.** — Deux formules sont possibles :

1. L'une, au bichromate de potassium :

Préparer une solution mère de bichromate de K recristallisé et séché à l'air pendant quarante-huit heures par dissolution de 10 g. de ce sel dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée bouillie. 8,5 cm<sup>3</sup> de cette solution mère complétés à 20 cm<sup>3</sup> avec de l'eau distillée bouillie mise dans une cuve de 2 mm. d'épaisseur donnent un filtre d'arrêt (B. C. 85) qui convient bien dans le cas particulier de l'auramine. La tolérance est de  $\pm 0,2$  cm<sup>3</sup> de solution mère.

2. L'autre à la sulfone-phénol-phtaléine :

Préparer également une solution mère de phénol-sulfone-phtaléine par dissolution à chaud de 250 mg. de ce produit dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau glycérinée à 50 p. 100 bouillie et phéniquée à 1 g. p. 100. 4,8 cm<sup>3</sup> de cette solution complétés à 20 cm<sup>3</sup> avec de l'eau distillée glycérinée à 50 p. 100 et phéniquée à 1 p. 100 donnent, sous l'épaisseur de 2 mm., un écran (P. S. P. 48) équivalent au précédent. La tolérance est de  $\pm 0,1$  cm<sup>3</sup> de solution mère.

L'un ou l'autre de ces écrans est placé sur l'oculaire.

**COMPARAISON DES COURBES D'ABSORPTION.** — Le filtre bleu *Reichert 61* (1 mm. d'épaisseur) laisse passer des radiations de 3.340 Å environ à 4.950 Å avec un maximum de transmission (55 p. 100) à 4.100 Å.

Le filtre jaune *Reichert 32* (2 mm. d'épaisseur) de 5.250 Å environ jusqu'à l'infra-rouge avec un maximum (98 p. 100) à 5.780 Å.

Le filtre bleu C. N. C. 5 (5 mm. d'épaisseur) 4.850 Å à 3.150 Å avec un maximum (75 p. 100) à 4.000 Å.

Le filtre bleu C. N. D. 5 (5 mm. d'épaisseur) de 3.610 Å à 4.850 Å avec un maximum (60 p. 100) à 4.200 Å.

Le filtre jaune B. C. 85 (2 mm. d'épaisseur) de 5.130 Å à l'infra-rouge (95 p. 100) à 5.500 Å.

Les courbes de ces différents filtres sont portées sur la figure 1, ainsi que la courbe d'absorption et de fluorescence de l'auramine (voir courbe 2, mémoire précédent, p. 218), à savoir 2 maxima d'absorption, l'un à 3.600 Å, l'autre à 4.500 Å et un maximum de fluorescence à 5.450 Å avec 4.700 Å et 6.200 Å pour longueurs d'ondes extrêmes.

DISCUSSION. — De l'examen de ces courbes, il ressort :

1. Que l'écran bleu *Reichert 61* laisse passer les longueurs d'ondes excitatrices de la fluorescence de l'auramine (3.660 Å et 4.500 Å) avec un coefficient de transmission respectivement égal à 33 p. 100 et 45 p. 100, tandis que notre écran C. N. D. 5 les transmet à raison de 2 p. 100 et 50 p. 100 et notre écran C. N. C. 5 à raison de 60 p. 100 et 55 p. 100.

C'est donc l'écran C. N. C. 5 qui est le meilleur.

2. Que l'écran jaune *Reichert 32* transmet moins de 70 p. 100 de la

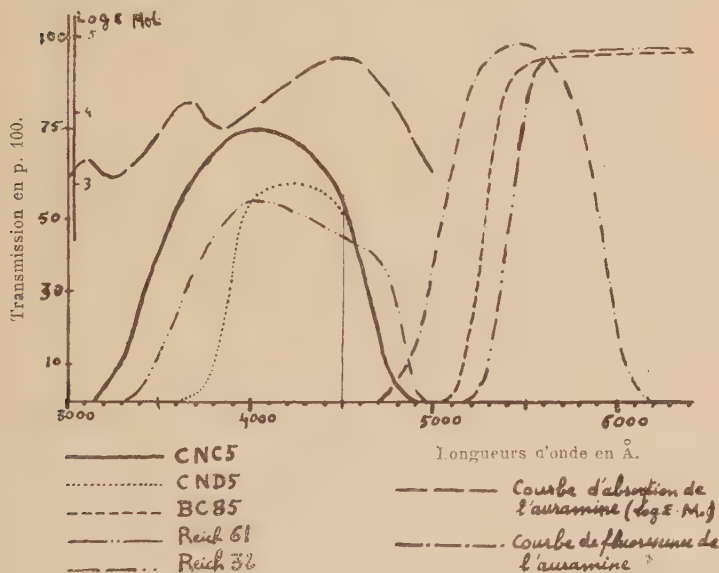


FIG. 1.

fluorescence, tandis que les nôtres (B. C. 85 et P. S. P. 48) laissent passer 75 p. 100 de la fluorescence.

3. Qu'avec les filtres C. N. C. 5 et B. C. 85 ou P. S. P. 48, la transmission pour la longueur d'onde 4.950 Å est à peu près nulle. Le fond est donc pratiquement noir, ce qui permet une bonne visibilité par effet de contraste.

CONCLUSION. — En utilisant deux écrans liquides, le premier au sulfate de cuivre ammoniacal (C. N. C. 5), le second, soit au bichromate de potassium (B. C. 85), soit à la phénol-sulfone-phthaléine (P. S. P. 48), on obtient une visibilité des microorganismes, rendus fluorescents par l'auramine, meilleure qu'avec les écrans de verre actuels. En effet, l'écran bleu permet une meilleure excitation de la fluorescence et l'écran jaune une visibilité supérieure de la lumière de fluorescence tranchant sur le fond obscur du champ microscopique.

# RECHERCHES SUR LA GÉLIFICATION DES PROTÉINES

## IV. — ACTION DES ALCOOLS

par E. BARBU et M. MACHEBOEUF (\*).

(Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique.)

Dans des publications antérieures [1], [2], [3], nous avons envisagé la gélification en fonction de la nature des protéines, de leur concentration, de l'acidité, de l'alcalinité, de la température et de la pression.

Nous étudions aujourd'hui un nouveau facteur, la teneur en certains alcools primaires aliphatiques (méthanol, éthanol, propanol et *n*-butanol) en opérant seulement à la pression atmosphérique. Les variables envisagées furent : pH, température, teneur en alcool, teneur en protéines et nature de l'alcool.

### GLOBULINES.

Il s'agit de pseudoglobulines  $\gamma$  de sérum de cheval, préparées comme dans nos travaux antérieurs et bien débarrassées des sels par dialyse.

**ACTION DE L'ÉTHANOL EN FONCTION DU pH A LA TEMPÉRATURE ORDINAIRE (ENVIRON 20° C).** — Nous avons préparé une série de 12 solutions protéiques de même concentration (14 p. 100), mais de pH différents, échelonnés de 2,5 à 12,5. (Au-dessous de pH 2,5, la solution gélifie avant que l'on puisse ajouter de l'alcool par la seule action de l'acidité. Au-dessus de pH 11, la gélification se produit également sans alcool, mais elle n'est pas instantanée, et l'on a le temps d'ajouter l'alcool.) Pour faire varier les pH, nous avons utilisé uniquement de l'acide chlorhydrique ou de la soude.

Pour chaque essai, un échantillon de chacune des 12 solutions est mélangé avec un volume égal d'un mélange d'eau et d'alcool de titre connu. Ceci dilue les protéines dans la proportion de 1 à 2, si bien que, dans tous les cas, la concentration finale en pro-

(\* Société Française de Microbiologie, séance du 1<sup>er</sup> juillet 1948.



téines est 7 p. 100, mais les teneurs en alcool et les pH sont fixés à notre volonté. Les mélanges sont effectués lentement au moyen de liquides préalablement refroidis à 0° C, et c'est seulement lorsque l'homogénéité est obtenue qu'on laisse la température s'élever jusqu'à 20° C. On abandonne alors les mélanges dans des tubes bouchés et l'on observe fréquemment leur état.

Le diagramme ci-contre (N° 1) résume nos résultats, les courbes limitent les zones pour lesquelles les mélanges furent finalement liquides ( $L_1$ ,  $L_2$  et  $L_3$ ) et les zones de gélification ou de précipitation. Partout où il y a gélification, sans séparation d'un liquide

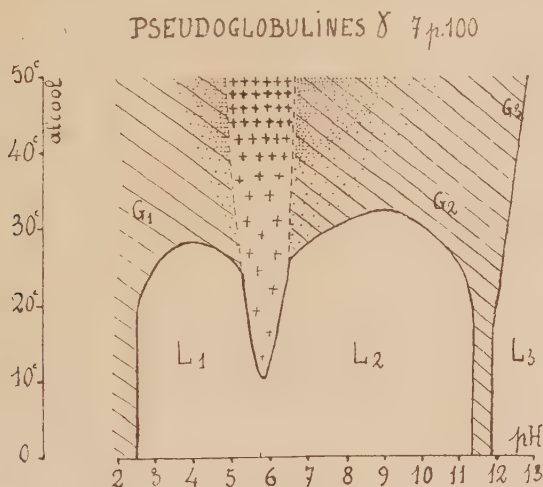


FIG. 1.

et d'un précipité, le graphique comporte des hachures obliques. Lorsque le gel est opalescent ou bien trouble, des points sont surajoutés aux hachures et la quantité de points par unité de surface est fonction de l'intensité de l'opalescence ou du trouble dans le gel. Pour des pH très voisins de l'isoélectrique (5,8) il ne se forme jamais de gel mais un précipité séparé d'un liquide. Ceci est indiqué dans le diagramme par des croix dont le nombre est fonction de la quantité de précipité.

Nous ne tenons pas compte, pour tracer le diagramme, du temps que met le gel à se former. En effet, la gélification est plus ou moins rapide suivant les cas (1).

Nous avons limité la durée de nos expériences et considéré

(1) La gélification est d'autant plus rapide que l'on s'éloigne du pH iso-électrique et que la teneur en alcool est plus grande.

comme définitivement liquides les mélanges qui n'étaient pas gélifiés après quatorze jours. C'est d'ailleurs seulement très près des frontières des zones que la gélification est lente et demande plus de deux jours. Partout ailleurs, elle est rapide.

Nous retrouvons pour l'alcool (comme pour la température ou la pression) une zone isoélectrique qui se différencie profondément des zones de gélification. La précipitation isoélectrique débute déjà pour des concentrations alcooliques très faibles, mais la proportion des protéines insolubilisées augmente lorsque la concentration de l'alcool s'élève.

En dehors de la zone de précipitation isoélectrique mais à un pH inférieur à 12, deux phénomènes semblent se surajouter : 1° *la gélification* (formation d'un gel limpide) et 2° *la formation d'un trouble*. Plus on s'éloigne de la zone isoélectrique, moins le gel est trouble et au delà d'une limite assez bien définie, le gel est limpide. Au delà de pH 12 nous savons que, sans alcool, il se fait rapidement un gel qui se dissout ensuite lentement (transformation de la protéine sous l'influence de la forte alcalinité). En présence d'alcool les gels sont plus stables. Si l'on compare le diagramme avec ceux de nos travaux antérieurs, on voit que l'alcool augmente la surface des zones de gel.

**ACTION DE LA TEMPÉRATURE.** — L'action de la température est complexe. Voici un résumé des observations faites en opérant avec des solutions protéiques assez concentrées (7 p. 100, par exemple) :

1° Au-dessous de 0° C, en présence d'alcool, il ne se forme des gels que pour les pH très éloignés de l'isoélectrique ( $\text{pH} < 3,5$  et  $\text{pH} > 10$ ). Mais lorsque le pH est proche de l'isoélectrique, il se forme des précipités, même pour des concentrations alcooliques assez faibles.

2° En laissant les mélanges se réchauffer à la température ordinaire, plusieurs cas peuvent se présenter :

a) Si le pH est proche de l'isoélectrique, le précipité qui s'était formé à froid se dissout rapidement (à condition que la concentration alcoolique ne soit pas trop forte) puis, dans les heures qui suivent, il apparaît lentement un nouveau précipité de protéine dénaturée.

b) Si le pH est un peu plus éloigné de l'isoélectrique on obtient, suivant les concentrations en alcool et le pH, une solution ou un gel.

3° Lorsqu'un mélange est gélifié à la température ordinaire et qu'on le chauffe progressivement jusqu'à 100° C, on observe généralement que le gel persiste (en s'opacifiant). Cependant lorsque le pH est très éloigné de l'isoélectrique, on voit le mélange se liquéfier à haute température. Cette liquéfaction thermique des gels très alcalins ou très acides est réversible car le refroidissement fait réapparaître le gel.

4° Lorsqu'un mélange est liquide à la température ordinaire, le chauffage finira toujours par produire un gel, sauf si le pH est supérieur à 12. Le gel sera limpide ou trouble suivant le pH et la concentration en alcool.

Le phénomène de précipitation isoélectrique par l'alcool et le phénomène de gélification sont bien distincts car la température influe sur eux de façons différentes ; le froid favorise la précipitation tandis qu'il inhibe l'action gélifiante de l'alcool.

Il faut d'ailleurs distinguer la précipitation isoélectrique par l'alcool à froid de la précipitation isoélectrique par l'alcool à chaud.

En effet, le précipité formé au-dessous de 0° C se remet en solution si la température s'élève ou si l'on dilue par de l'eau. Cette précipitation est donc réversible. Au contraire, les précipités formés à chaud ne se dissolvent pas si l'on refroidit ou si l'on dilue (2).

Si, pour former le précipité isoélectrique à froid, on ajoute trop d'alcool ou si la concentration protéique est trop grande, le précipité ne se dissoudra pas entièrement lorsque le mélange se réchauffera à la température ordinaire. Si l'on chauffe plus le mélange, on pourra ainsi atteindre la température de précipitation irréversible sans qu'il y ait, à aucun moment, disparition totale du précipité ; on pourrait donc croire que les deux types de précipitations isoélectriques sont en continuité.

Si le pH n'est pas trop proche de l'isoélectrique (sans en être trop éloigné), vers pH 8 par exemple, le précipité formé à froid par l'alcool se dissout dès que l'on réchauffe un peu, puis si l'on chauffe suffisamment, on obtient un gel.

Tous ces faits se comprennent plus aisément en observant le graphique ci-contre (fig. 2). Ce graphique fut tracé de la façon suivante : Nous avons porté en abscisses les pH et en ordonnées les températures pour lesquelles il se formait un gel ou un précipité. Les expériences furent effectuées pour diverses concentrations en éthanol en maintenant toujours constante la concentration protéique (9 p. 100 de pseudoglobulines  $\gamma$ ). Les mélanges étaient tous effectués à basse température ( $-10^{\circ}$ ) et placés dans des ampoules de verre. On laissait alors réchauffer lentement en observant les changements d'aspect. Les ampoules furent ensuite scellées, puis placées dans des bains-marie de températures progressivement croissantes (voir plus de détails sur le mode opératoire dans notre mémoire antérieur [2]).

Sur la figure 2, nous avons rassemblé les diagrammes corres-

(2) A la température ordinaire déjà, les protéines se dénaturent lentement sous l'influence de l'alcool et il se forme un précipité qui ne se dissoudra plus par dilution.



pendant à quatre concentrations alcooliques différentes : 7, 10, 20 et 30 p. 100. La même figure contient, à titre de comparaison, le diagramme correspondant à une teneur nulle en alcool ; ce diagramme fut tracé en opérant comme dans notre travail antérieur [2].

Diverses conclusions peuvent être tirées de l'étude de la figure 2.

1° L'alcool favorise la gélification par chauffage pour tous les pH en dehors de la zone isoélectrique ; a) l'action est à peu près

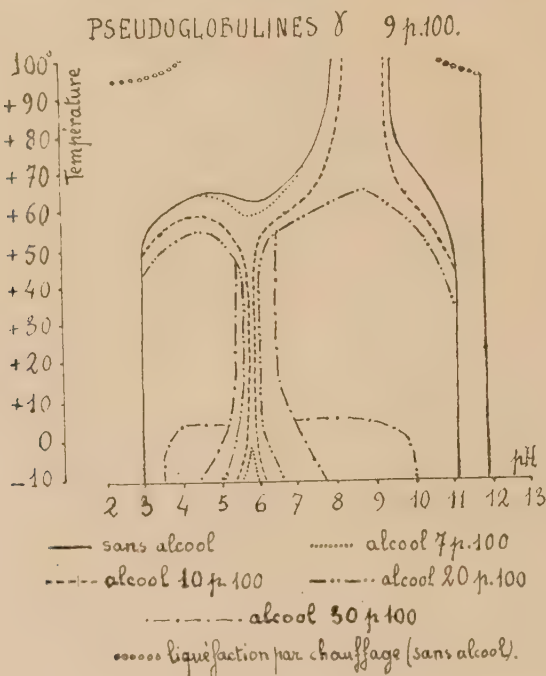


FIG. 2.

proportionnelle à la concentration en alcool tant que cette concentration reste faible. Par exemple l'abaissement de la température de gélification à un pH donné tel que 4 est deux fois plus grand pour 20 p. 100 d'alcool qu'il l'est pour 10 p. 100.

b) Lorsque la concentration alcoolique est plus élevée, on voit se surajouter des phénomènes de dénaturation d'un autre ordre qui favorisent considérablement la gélification et la font apparaître même aux basses températures (+ 5° C pour 30 p. 100 d'alcool à pH 8 par exemple).

2° L'alcool favorise la précipitation irréversible par chauffage dans la zone isoélectrique.

3° L'alcool provoque au voisinage de l'isoélectrique une précipitation réversible lorsque la température est suffisamment basse et la zone de pH dans laquelle a lieu cette précipitation est d'autant plus large que la teneur en alcool est plus élevée. D'autre part, pour une même concentration en alcool, la zone de pH où a lieu la précipitation à froid s'élargit lorsque la température baisse. Une expérience très simple montre que précipitation réversible à froid et précipitation irréversible à chaud sont deux phénomènes différents. Un mélange contenant 9 p. 100 de protéines à pH isoélectrique et 7 p. 100 d'alcool est un liquide limpide à la température ordinaire. Si l'on refroidit vers  $-5^{\circ}$ , il se forme un considérable précipité. Si la température s'élève ensuite, le précipité se remet en solution puis, si la température s'élève vers  $50^{\circ}$ , il apparaît un louche et finalement, vers  $70^{\circ}$  C, un précipité gélatineux qui ne disparaît pas si l'on refroidit.

Lorsque l'on opère avec des concentrations alcooliques plus grandes ou dans des liquides trop riches en protéines, les deux types de précipités ne se distinguent plus aussi bien, car leurs domaines d'apparition se rejoignent. Ceci explique que la distinction entre précipitation réversible par de petites quantités d'alcool froid et précipitation irréversible par les mêmes quantités d'alcool chaud n'ait pas été faite nettement par des auteurs qui ont étudié l'action de l'alcool sur les protéines.

La figure 2 montre très bien comment se rejoignent ces deux domaines de précipitation isoélectrique lorsque s'élève la concentration en alcool.

C'est sur la précipitation par l'alcool à très basse température qu'est basé le principe de la technique de délipidation déjà très ancienne de Hardy et Gardiner [4] dont dérivent les intéressantes recherches de Saïas [5], de Cohn [6] et de Pillemer [7]. Mais l'étude du phénomène n'avait jamais, à notre connaissance, été effectuée dans le sens où nous l'avons fait.

**INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ALCOOL.** — Tout ce qui précède correspond à l'alcool éthylique ; nous avons reproduit les essais avec 3 autres alcools primaires : méthanol, propanol et *n*-butanol. L'allure générale des diagrammes (fig. 3) est la même mais on note une influence considérable du radical aliphatique qui supporte la fonction alcool.

Pour la zone isoélectrique, les différences entre les alcools sont assez faibles. Mais en dehors de cette zone, la gélification est, pour chaque pH, obtenue par une concentration alcoolique moindre lorsque le poids moléculaire de l'alcool est plus grand.

L'action gélifiante du propanol est considérable. Le butanol est trop peu soluble dans l'eau pour qu'il soit possible de tracer avec précision un diagramme comparable à ceux tracés pour les

autres alcools. Cependant son action gélifiante est nettement plus intense encore que pour le propanol et nous avons tracé en pointillé un diagramme approximatif rappelant ce fait.

Dans la figure 3, pour ne pas surcharger le dessin, nous n'avons pas tracé des courbes spéciales pour chaque alcool dans la zone de précipitation isoélectrique. Mais nous devons noter que la concentration alcoolique pour laquelle débute la précipitation au pH isoélectrique varie légèrement avec l'alcool envisagé (particulièrement le propanol). Pour le propanol, la précipitation isoélectrique des globulines ne s'observe pas à concentration

### PSEUDOGLOBULINES $\gamma$ 7 p.100.

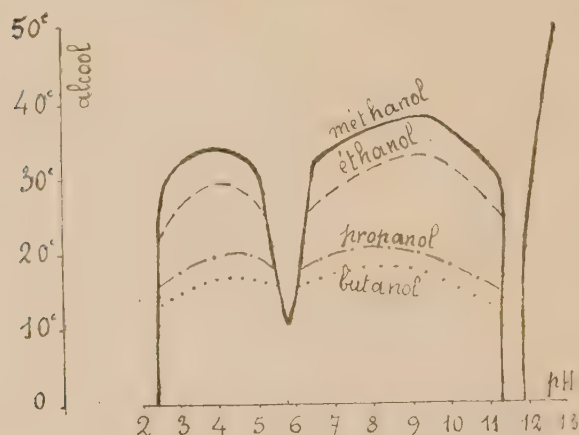


FIG. 3.

aussi basse que pour le méthanol et l'éthanol. De plus, la précipitation isoélectrique par le propanol présente des modalités curieuses et compliquées. Jirgensons [8], en travaillant différemment et sur des solutions très diluées en protéines, a déjà noté certains de ces faits, mais nous n'insistons pas aujourd'hui sur ce point car le présent travail porte sur la gélification et non sur la précipitation des protéines par les alcools.

\*  
\* \*

En somme, tous nos diagrammes sont compliqués car ils résument plusieurs phénomènes.

1° Précipitation isoélectrique des protéines par l'alcool (probablement par diminution de la constante diélectrique du milieu).



2° Empêchement de cette précipitation par alcalinisation ou acidification (lorsque le pH s'éloigne de l'isoélectrique, l'augmentation de charge électrique des protéines tend à les maintenir en solution).

3° Transformation de la molécule protéique par les alcalis ou les acides en une nouvelle molécule capable de contracter des liaisons avec d'autres molécules semblables pour former le gel.

4° Dénaturation des protéines par l'alcool à la température ordinaire. Cette dénaturation favorise les associations moléculaires, donc la formation de gels. L'alcool doit se lier avec la protéine par sa fonction alcoolique. Les radicaux alcoyls hérissent alors la surface de la molécule protéique, ils sont hydrophobes et ceci diminue la solubilité de la protéine en favorisant d'autre part l'union intermoléculaire par forces de Van der Waals. Ces forces étant d'autant plus actives que le radical alcoyl est plus long, les alcools gélifient d'autant mieux que leur poids moléculaire est plus élevé.

5° Modification plus profonde et irréversible de la protéine par les alcalis très concentrés ( $\text{pH} > 12$ ) qui fait disparaître la capacité de gélification. Il s'agit peut-être d'une hydrolyse partielle de la protéine ou bien d'une tautomérisation (énolisation) des fonctions amides qui les rend plus hydrophiles. Ici intervient peut-être un déroulement de la chaîne polypeptidique devenue plus hydrophile et également plus chargée électriquement. Nous n'avons pas encore apporté beaucoup d'attention sur l'action des alcalis très concentrés et nous ne cherchons pas à choisir entre les hypothèses possibles ici. Mais notons déjà que l'alcool à doses suffisantes inhibe la liquéfaction secondaire des gels par les alcalis trop concentrés (voir zone G<sub>2</sub> de la figure 1).

Toutes les expériences ci-dessus furent effectuées sur des solutions très concentrées en protéines (7 ou 9 p. 100 de concentration finale dans les mélanges). Si l'on opère à concentration bien plus faible, vers 1 p. 100, par exemple, on n'observe jamais la formation d'un gel. (Nous interprétons ce fait par un trop grand éloignement des molécules protéiques pour que la probabilité d'association intermoléculaire pendant la dénaturation soit suffisante). Mais on sait que l'alcool peut encore précipiter les protéines dans ces conditions. Nous avons donc étudié la précipitation de globulines par les divers alcools primaires en fonction du pH. Des solutions de sérum pseudo-globulines  $\gamma$  de Cheval à 2 p. 100, à pH divers, furent préparées. A 1 ml. de solution (refroidie à 0°) on ajoute lentement de l'alcool absolu (refroidi à  $-10^\circ$ ) et l'on note, pour chaque pH, la quantité d'alcool à ajouter pour que le mélange soit trouble. On obtient les courbes ci-contre (fig. 4).

On retrouve donc pour la précipitation par les alcools des solutions protéiques diluées, une considérable influence du radical

alcoyl porteur de la fonction alcoolique. Cette action est comparable à celle notée ci-dessus pour la gélification (3).

Terminons en insistant sur l'importance de la concentration en protéines sur le résultat de l'action des alcools : une même concentration en alcool donne pour un même pH un liquide limpide ou bien un gel suivant la teneur en protéines.

#### ALBUMINES.

Nos expériences ont porté sur la sérum-albumine cristallisée et soumise à une longue dialyse.

Rappelons que cette albumine en solution aqueuse gélifie à la

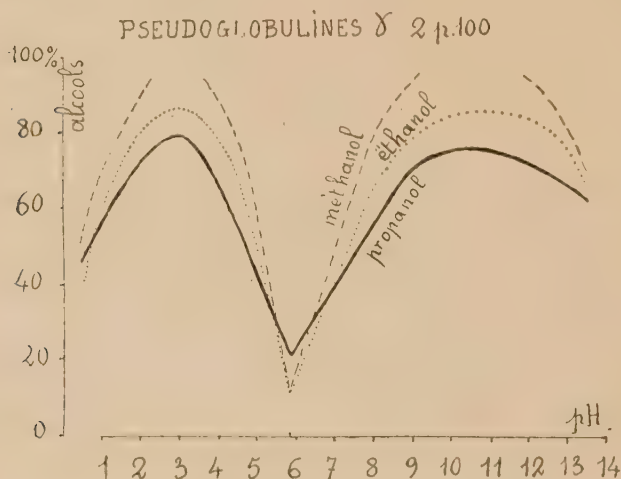


FIG. 4.

température ordinaire par les alcalis lorsque le pH est compris entre 10,8 et 12,2, mais qu'elle ne gélifie pas par acidification même à pH 1 (voir notre travail antérieur [4]).

(3) Notons que les courbes du schéma 4 correspondent à des expériences effectuées avec des solutions très fraîchement amenées aux pH correspondants. Si l'on avait attendu après l'alcalinisation, les résultats pour les pH très élevés eussent été différents. Nous savons, en effet, qu'au delà de pH 12, en solution protéique plus concentrée, on observe d'abord une gélification, puis, dans les heures qui suivent, une liquéfaction. L'alcali trop concentré détruit le gel primitivement formé et modifie irréversiblement la protéine (celle-ci ne gélifie plus si l'on ramène le pH dans une zone correspondant à la gélification de la protéine originelle). Notons aussi que les points marqués sur la figure 3 correspondent à l'apparition du premier louche stable et non à une précipitation massive.

Si l'on élève suffisamment la température, on obtient des gels pour tous les pH compris entre 3,5 et 12, sauf pour une zone voisine de l'isoélectrique où il se fait une précipitation. En étudiant l'action de l'alcool à divers pH, nous trouvons une fois de plus de profondes différences entre albumines et globulines. Le diagramme ci-contre (fig. 5) correspond à des essais effectués en maintenant constamment la concentration en albumine à 7 p. 100. Les conditions opératoires et les conventions graphiques sont les mêmes que pour la figure 1 ci-dessus. Les conclusions sont les suivantes :

1° Au voisinage de l'isoélectrique (pH 4,8) on trouve une zone

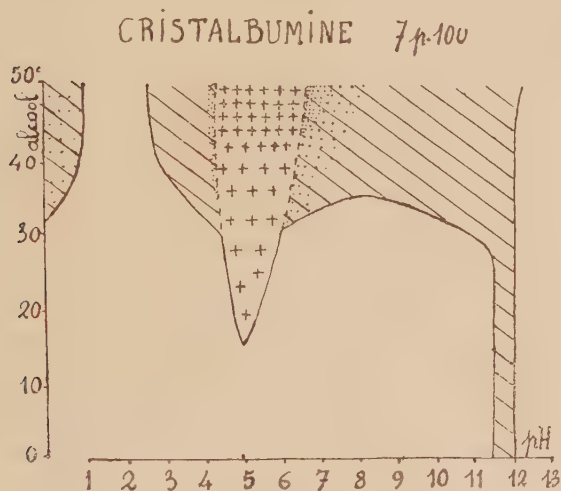


FIG. 5.

où l'éthanol provoque une précipitation dès qu'il atteint une concentration voisine de 15 p. 100. Pour tous les autres pH le mélange reste limpide pour une concentration alcoolique aussi basse.

2° En milieu alcalin, les phénomènes sont assez semblables à ceux observés pour les globulines, bien qu'il faille élever un peu plus la teneur en alcool pour provoquer la gélification (les zones de gels clairs sont plus étendues pour les albumines que pour les globulines).

3° En milieu acide, il existe une large zone de pH (de 1 à 2,5) pour laquelle il ne se produit pas de gélification, même si la teneur en alcool s'élève jusqu'à la limite fixée par nos conditions expérimentales (50 p. 100).

4° La précipitation isoélectrique se différencie très nettement



ici encore de la gélification comme nous l'avions déjà observé en étudiant la gélification par pression ou par chauffage.

Divers auteurs ont déjà étudié la précipitation d'albumines par l'éthanol en fonction du pH, mais ils opéraient sur des solutions protéiniques diluées si bien que la formation de gels ne fut pas observée. Le phénomène qu'ils étudiaient correspondait seulement à l'apparition de troubles ou de précipités que nous notons dans nos diagrammes par des pointillés ou des croix.

#### CONCLUSIONS.

1° Dans certaines conditions de pH, l'addition d'éthanol ou d'autres alcools primaires aliphatiques à des solutions protéiques suffisamment concentrées provoque, dès la température ordinaire, la formation de gels. L'action gélifiante est d'autant plus intense que le radical alcoyl de l'alcool est plus long.

2° Les alcools primaires favorisent la gélification des solutions protéiques par chauffage à tous les pH où la gélification peut être obtenue sans alcool.

3° Les alcools protègent notablement contre la liquéfaction secondaire des gels protéiques obtenus en milieu très alcalin ( $\text{pH} > 12$ ).

4° Lorsque le pH est proche de l'isoélectrique de la protéine, les alcools ne provoquent pas la formation de gels, mais de précipités. Les précipités obtenus à basse température (au-dessous de  $+4^\circ$ ) se remettent en solution si l'on dilue ou si l'on réchauffe. Plus la concentration alcoolique est élevée, plus est large la zone de pH dans laquelle peut être obtenue cette précipitation réversible.

5° La sérum-albumine cristallisée se comporte en milieu alcalin et au voisinage de l'isoélectrique à peu près comme les globulines, mais en milieu plus acide que l'isoélectrique, la différence est très grande. On constate, par exemple, que, pour certains pH, la gélification n'est pas obtenue pour les albumines même en présence de 50 p. 100 d'alcool.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARBU (Em.) et MACHEBOEUF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 123.
- [2] BARBU (Em.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 300.
- [3] BARBU (Em.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 6 juin 1948 (sous presse).
- [4] HARDY et GARDINER. *J. Physiol*, 1910, **40**, 68.
- [5] SAÏAS. *C. R. Acad. Sci.*, 1942, **214**, 393 et *Thèse Doctorat Pharmacie*, Paris, 1942.
- [6] COHN (E. J.). *J. Clin. Invest.*, 1944, **23**, 417 et *Brevet U. S.*, 2.390.074, 4 décembre 1945.
- [7] PILLEMER et HUTCHINSON. *J. Biol. Chem.*, 1945, **158**, 299.
- [8] JIRGENSONS (Br). *Kolloid Beihefte*, 1936, **44**, 285.

## ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR L'ACTIVITÉ DE L'URÉASE DE SOJA

par F. GROS et S. JEULIN.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique. ,  
Professeur MACHEBOEUF.)

Florey [4] (1943) puis Turner [2] (1943) et Vargas [3] (1944) ont signalé que la Pénicilline inhibait fortement la décomposition de l'urée par l'uréase ; Scudi [4] (1944), ayant repris ce travail, a montré que les inhibitions observées étaient le fait d'impuretés présentes dans la pénicilline. Tous ces auteurs avaient utilisé, en effet, des préparations insuffisamment purifiées, tandis que Scudi et ses collaborateurs, ayant mis en œuvre de la pénicilline cristallisée (1.650 U. O. par milligramme), n'ont trouvé aucune inhibition de l'activité uréasique.

Dans le présent travail, nous analyserons les différents facteurs qui influencent l'activité uréasique d'une préparation faite à partir de fèves de soja, et nous étudierons son comportement en présence de trois antibiotiques : la pénicilline, la streptomycine et la tyrothricine.

### MODE OPÉRATOIRE.

L'uréase utilisée est préparée par précipitation acétonique d'un extrait aqueux de fèves de soja. Le processus est répété trois fois. On obtient finalement une poudre jaune, qui est dissoute dans l'eau extemporanément ; c'est cette solution que l'on emploie, après centrifugation des parties insolubles. Pour nos essais avec la pénicilline et la streptomycine, nous avons employé des préparations commerciales très purifiées. La tyrothricine a été utilisée sous forme d'émulsions aqueuses homogènes, préparées à partir du produit également très purifié. On suit le dégagement d'ammoniaque après incubation à 37°, par la technique de Raynaud et Gros [5]. Les tubes, après leur sortie du bain-marie, sont refroidis dans un mélange réfrigérant ; on prélève 2 cm<sup>3</sup> pour y doser l'ammoniaque. La neutralisation préalable s'effectue en présence de thymolphthaléine. Les tubes contenant l'uréase seule ou l'urée seule n'ont révélé aucun dégagement d'ammoniaque. L'ammoniaque est titré par de l'acide chlorhydrique N/100. L'erreur absolue du titrage ne dépasse pas 0,2 cm<sup>3</sup> N/100.

## RÉSULTATS.

I. ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR L'ACTIVITÉ URÉASIQUE EN FONCTION DE DIVERSES CONCENTRATIONS EN URÉE. — L'incubation a lieu pendant trente minutes à 37° et pH 7,0. On utilise 0,5 ml. de préparation uréasique et des solutions d'urée à différentes concentrations. Le milieu est tamponné par un mélange de phosphates et additionné de toluène.

Les concentrations en pénicilline et en streptomycine sont respectivement de 1.000 et 2.000 unités bactériostatiques par millilitre. Pour la tyrothricine, chaque tube renfermait 400 µg. de cet antibiotique par millilitre.

Dans le tableau ci-dessous, nous indiquons les quantités en ammoniacque N/100 trouvées dans 2 ml. de liquide à la fin de l'incubation, en présence de quantités variables d'urée et avec ou sans antibiotiques.

## Activité de l'uréase en fonction de la concentration en urée.

CONCENTRATION en urée grammes p. 1.000	TÉMOIN	PÉNICILLINE	STREPTOMYCINE	TYROTHRICINE
1 . . . . .	1,1	1,2	1,4	1,45
2 . . . . .	2,2	2,3	2,37	2,25
3 . . . . .	3,35	3,4	3,35	3,35
4 . . . . .	4,35	4,4	4,45	4,6
5 . . . . .	5,45	5,4	5,6	5,4
6 . . . . .	6,4	6,1	5,9	6,5
10 . . . . .	7,9	7,2	6,7	8,1

Comme on le voit, aucun des antibiotiques mis en œuvre ne manifeste d'action inhibitrice vis-à-vis de l'activité uréasique. Nous confirmons ici en particulier le point de vue de Scudi : les pénicillines hautement purifiées n'ont pas d'action sur l'uréase dans les conditions normales. Toutefois, nous avons recherché si, pour des concentrations beaucoup plus importantes en antibiotiques, on n'observait pas quelques modifications du processus enzymatique.

Le tableau ci-contre prouve que, même pour des doses considé-

TUBES	AMMONIAQUE N/100 P. 5 ML. (urée : 1 p. 1.000)
Témoin . . . . .	3,07 ml.
Pénicilline 50.000 U. O. . . . .	3,15 ml.
Streptomycine 100.000 U. O. . . . .	3,07 ml.
Tyrothricine 10 mg. . . . .	3,20 ml.



rables de pénicilline, de streptomycine ou de tyrothricine, l'activité uréasique n'est pas modifiée à pH 7,0.

II. ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR L'ACTIVITÉ URÉASIQUE EN FONCTION DU pH. — En nous inspirant du fait que les inactivateurs classiques de l'uréase agissent d'autant plus vite que le pH fonctionnel est plus alcalin, nous avons voulu rechercher si les conclusions précédentes sont valables pour tous les pH.

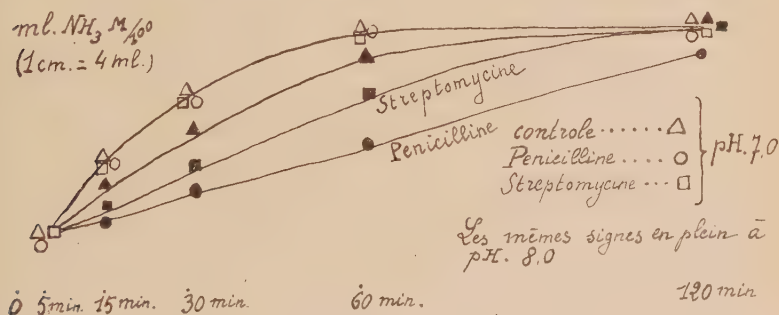
Pour ce faire, nous avons établi d'abord comment variait l'activité uréasique avec des pH différents.

Voici les résultats obtenus, en utilisant une solution d'urée à 1 p. 1.000 et 0,5 ml. de préparation diastasique après trente minutes d'incubation à 37°.

pH.	4,6	5,2	6,0	6,8	7,4	8	9,2
NH <sub>3</sub> N/100 p. 5 ml.	1,67	2,10	2,50	2,67	2,92	2,4	1,0

On voit que le pH optimum est très voisin de 7,0 et que l'activité diastasique subit peu de modifications entre les pH 6 et 8. Pour les pH très acides et très alcalins, l'activité est considérablement diminuée.

Nous avons alors étudié la décomposition d'une quantité déterminée d'urée (10 mg.) en fonction du temps, en nous plaçant à deux pH différents : 7,0 et 8,0 et recherché si les antibiotiques, dans ces conditions, n'apportaient aucun changement dans le cours de la décomposition de l'urée.



Les courbes ci-contre résument toutes nos expériences. Comme on le voit, la pénicilline et la streptomycine, à un moindre degré, ralentissent nettement la décomposition de l'urée à pH 8,0, alors qu'elles sont sans action sur ce phénomène à pH 7,0. Ce fait nous permet de rapprocher ces deux antibiotiques d'un certain groupe de substances dont l'action inhibitrice vis-à-vis de

l'urée est connue, et qui inactivent le ferment d'autant plus vite que le pH est plus élevé. On admet, depuis Bersin, que l'urée est inactivée par l'intermédiaire de ses groupements thiolés, qui subissent, au contact de certains inactivateurs, une oxydation d'ailleurs réversible, et passent à l'état de mercaptides inactifs.

Il est intéressant de rappeler ici que la pénicilline et la streptomycine possèdent la propriété de se fixer sur les groupements sulfhydriles libres en subissant une inactivation irréversible. Vraisemblablement, c'est ce mécanisme que l'on doit invoquer ici pour expliquer le ralentissement observé dans l'activité des préparations uréasiques. Si l'inhibition complète de la diastase n'a pas lieu, c'est que les antibiotiques subissent eux-mêmes une inactivation irréversible qui croît avec le temps, lorsqu'ils se trouvent en présence de groupements SH réducteurs, en milieu alcalin. On peut donc penser que le phénomène observé ici est une résultante.

Ces conceptions peuvent trouver une confirmation dans le fait que l'addition de groupements SH libres à des préparations d'urée permet la suppression du ralentissement observé dans l'activité uréasique, en présence d'antibiotiques. Le tableau ci-contre rend compte des résultats que nous avons obtenus (durée : une heure).

	pH 7,0 (cm <sup>3</sup> . NH <sub>4</sub> N/100 p. 5 ml.)	pH 8,0
Urée seule (40 mg.) . . . . .	20,5	19,7
Urée + cystéine M/250 . . . . .	23,7	20,5
Urée + cystéine M/150 . . . . .		23
Urée + cystéine M/50 . . . . .	25	25
Urée + streptomycine (10.000 U. O.) . . . . .		16,5
Urée + streptomycine + cystéine M/250 . . . . .		17,5
Urée + streptomycine + cystéine M/150 . . . . .		18,2
Urée + streptomycine + cystéine M/50 . . . . .		25

En l'absence de streptomycine, la cystéine active la décomposition de l'urée. Cette activation classique de l'urée a lieu à pH 8,0 pour une concentration de M/150, tandis qu'à pH 7,0, elle apparaît déjà à des concentrations plus faibles (M/250). [Ce dernier fait est imputable à l'oxydation rapide de la cystéine en milieu alcalin, à la température de 37°.]

La cystéine M/250 est, pour la même raison, sans effet sur le ralentissement de l'urée qui accompagne l'addition de streptomycine. A partir de M/150, le ralentissement est pratiquement supprimé et, pour des concentrations plus élevées (M/50), l'excès de groupements SH est suffisant pour détruire toute action inhibitrice de la streptomycine et pour rétablir au même niveau le taux d'activation de l'urée, en présence et en absence d'antibiotique.

## CONCLUSION.

La pénicilline, la streptomycine et la tyrothricine, convenablement purifiées, sont sans action sur la décomposition de l'urée par des préparations d'uréase à pH 7,0, même pour des concentrations très élevées.

Par contre, à pH 8,0, la streptomycine et la pénicilline ralentissent l'activité uréasique, la tyrothricine demeurant sans action.

Le blocage réversible des groupements thiolés de l'enzyme par les antibiotiques est le mécanisme probable de cette action.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] FLOREY. *Lancet*, 1943, **1**, 387.
- [2] TURNER, HEATH et MAGASANIK. *Nature*, 1943, **152**, 326.
- [3] VARGAS (J.) et ESCUBAS (M.). *Trab. Inst. Nacion. Ci. Med.*, 1944, **1**, 293.
- [4] SCUDI et JELINEK. *Science*, 1944, **100**, 312.
- [5] RAYNAUD et GROS. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1003.



**RECHERCHES SUR LE MODE D'ACTION BIOCHIMIQUE  
DE LA STREPTOMYCINE  
DANS LE MÉTABOLISME D'UNE BACTÉRIE :  
*CLOSTRIDIUM SPOROGENES***

par F. GROS, M. MACHEBOEUF et SIMONE JEULIN.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique.)

Dans un précédent travail [1], nous avons étudié l'action de la Pénicilline sur le métabolisme de *Clostridium sporogenes*. Nous avons dégagé de ces recherches certaines conclusions qui peuvent servir de base à l'établissement d'une théorie générale du mode d'action de la Pénicilline.

Rappelons que la Pénicilline inhibe le catabolisme des mono-nucléotides et que divers processus dans lesquels les nucléotides eux-mêmes ou leurs dérivés peuvent intervenir, sont en outre influencés de ce fait.

On pouvait se demander si les modes d'action de la Streptomycine et de la Tyrothricine, antibiotiques dont les propriétés biologiques et chimiques présentent des contrastes nets avec celles de la Pénicilline, relèveraient de mécanismes différents. *Clostridium sporogenes* est sensible à la Streptomycine et à la Tyrothricine : comme presque tous les anaérobies sporulés, il est moins sensible à l'action de la Streptomycine qu'à celle de la Pénicilline. La sensibilité à la Tyrothricine est, par contre, relativement grande [48]. Nous étudierons le devenir des étapes fondamentales du métabolisme, en présence de Streptomycine ou de Tyrothricine, et nous adopterons comme plan de ces recherches celui qui nous a servi dans l'étude du mode d'action de la Pénicilline [1].

La Streptomycine diffère de la Pénicilline, non seulement par sa structure chimique, mais par les modalités de son action antibiotique : elle étend son activité, non seulement sur les germes à Gram-positif, mais sur de nombreux à Gram-négatif. L'optimum d'action se situe à pH 7,5 au lieu de 6,8. Enfin la Streptomycine ne semble pas être inactivable comme la Pénicilline par un ferment spécifique.

Il était légitime de se demander si le mode d'action de la Streptomycine n'allait pas s'écarter de celui de la Pénicilline.

Les travaux touchant au mode d'action de la Streptomycine sont très peu nombreux. En 1912, Cavallito [2] ayant montré qu'on pouvait inactiver la Streptomycine (et d'ailleurs la Pénicilline) par la cystéine, par le glutathion, ainsi que par les dipeptides renfermant de la cystéine, a proposé une hypothèse : la Streptomycine par l'un de ses groupements carbonyles se combinerait aux groupements soufrés des protéines cellulaires ; elle empêcherait de ce fait le métabolisme des chaînons peptidiques renfermant de la cystéine et bloquerait les synthèses protéiques.

Mais on a constaté que la dihydrostreptomycine, substance provenant de la réduction de la Streptomycine, qui présente des activités bactériostatiques nettes quoique plus faibles que la Streptomycine, n'est pas inactivable par la cystéine [3].

S. S. Cohen a mis en évidence [4] la formation de complexes insolubles entre la Streptomycine et les acides désoxy- et ribonucléiques. Massart [5] a constaté, dans le cas des complexes Streptomycine-acide ribonucléique que ces combinaisons ne sont pas sensibles à la ribonucléodépolymérase.

Dans le présent travail, nous avons analysé en détail les divers processus métaboliques chez *Clostridium sporogenes* traité par la Streptomycine, et recherché si certaines réactions n'étaient pas sensibles à l'action de la Streptomycine.

Nous avons toujours travaillé avec des cellules non proliférantes et avant d'aborder l'étude des divers métabolismes, il nous a paru bon d'étudier le devenir de ces cellules non proliférantes en contact avec de la Streptomycine. Nous ne nous étendrons pas ici sur les diverses expériences effectuées à ce sujet, nous rapporterons seulement celles dont les résultats ont servi à orienter la suite de nos recherches sur les métabolismes.

#### ACTION DE LA STREPTOMYCINE

##### SUR LES ÉCHANGES D'IONS PHOSPHORIQUES

DANS LA CELLULE NON PROLIFÉRANTE DE « *CLOSTRIDIUM SPOROGENES* ».

Si l'on étudie parallèlement des suspensions épaisses de *Clostridium* dans l'eau salée (9 p. 1.000) en présence et en l'absence de Streptomycine à basse température, + 4° C, on observe en l'absence de Streptomycine :

1° Une diffusion des ions phosphoriques cellulaires, dans le milieu extérieur. Cette diffusion croît avec la durée de l'expérience.

2° Une augmentation de la quantité totale des ions phosphoriques.

En présence de Streptomycine à raison de 1.000 U. par millilitre le phénomène de diffusion se déroule, dans ses grandes lignes comme dans les conditions normales. La néoformation

d'acide phosphorique est, au contraire, considérablement inhibée. Ces observations très simples nous permettent déjà de tirer quelques conclusions.

a) La Streptomycine n'exalte pas la sortie des ions phosphoriques dans le milieu ambiant. Sur ce point elle s'oppose donc aux agents lytiques (Tyrothricine) qui, eux, entraînent un brusque passage des phosphates à l'extérieur des cellules (1).

b) La Streptomycine inhibe la déphosphorylation de certaines combinaisons phosphoriques.

Pour étayer ces conclusions, nous présentons dans le tableau n° 1 les quantités d'ions phosphoriques en  $\mu\text{g}$  trouvées dans 5 ml. des émulsions microbiennes après des durées variables d'expériences avec et sans antibiotique.

TABLEAU 1.

	INSTANT initial			2 HEURES			48 HEURES			$T_{48}-T_0$
	Acide phosphorique			Acide phosphorique			Acide phosphorique			
	Int.	Ext.	$T_0$	Int.	Ext.	$T_2$	Int.	Ext.	$T_{48}$	
Témoin . . . . .	450	60	510	435	84	519	180	540	720	210
Streptomycine 10.000 U.	—	—	—	390	84	474	60	456	516	6

$T_0$  : quantité totale d'acide phosphorique présente dans le milieu au temps 0.

$T_2$  : quantité totale d'acide phosphorique présente dans le milieu après deux heures.

$T_{48}$  : quantité totale d'acide phosphorique présente dans le milieu après quarante-huit heures.

#### ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LE MÉTABOLISME GLUCIDIQUE.

Waksman [6] a signalé que l'action bactériostatique de la Streptomycine était nettement diminuée par la présence de glucides : il attribua ce fait à l'abaissement du pH au cours de la glycolyse. Mais Green, Ilverson et Waksman [7] constatent que l'action inhibitrice du glucose ne se fait sentir qu'en présence d'un substrat azoté déterminé, des peptones par exemple, et n'a pas lieu quand on remplace les peptones par un hydrolysât tryptique de protéines.

1. Voir à ce sujet un mémoire qui doit paraître prochainement sous nos signatures concernant le mode d'action de la Tyrothricine.



bien que l'abaissement du pH soit aussi important (pH 4,7). L'action antistreptomycine du glucose pourrait donc être liée à la synthèse des amino-acides, et non à des réactions particulières de la glycolyse dont la Streptomycine serait antagoniste. Il restait à prouver cependant que la Streptomycine n'interférait pas avec le métabolisme des glucides.

Dans le but d'élucider ce point, nous avons étudié l'influence de l'antibiotique sur le métabolisme glucidique en analysant successivement divers aspects de ce métabolisme.

A. ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR L'UTILISATION DU GLUCOSE PAR DES « CLOSTRIDIA » NON PROLIFÉRANTS. — Des germes furent récoltés après culture pendant douze heures sur milieu V. F. glucosé à 2 p. 1.000 ; ils furent lavés deux fois par de l'eau salée à 9 p. 1.000, puis mis en suspension (pH 7 par tampon phosphates M/75) dans de l'eau salée à 9 p. 1.000 en présence et en l'absence de glucose M/10, avec et sans Streptomycine (1.000 unités Oxford par millilitre). Les émulsions étaient très épaisses car elles contenaient environ 50 mg. de corps bactériens (pesés secs) par millilitre. Les mélanges ont été placés en anaérobiose stricte à la température de 37° C pendant des durées variables, puis on a dosé le glucose restant (après précipitation trichloracétique) par la méthode Hagedorn Jensen. Les chiffres expérimentaux sont rapportés dans le tableau n° II en milligrammes de glucose par 5 ml. d'émulsion.

TABLEAU II.

	INSTANT initial	4 HEURES	15 HEURES
Témoin . . . . .	92	71	31
Germes + Streptomycine 1.000 U./ml. . . . .	90	66	27

*Conclusion.* — La Streptomycine est sans action sur la consommation du glucose par *Clostridium* non proliférant (2).

B. EXPÉRIENCES EN TUBES DE THUNBERG SUR LES DÉSHYDROGÉNASES DU MÉTABOLISME GLUCIDIQUE. — On a préparé des émulsions microbiennes analogues aux précédentes mais plus diluées (25 mg. de germes secs par millilitre et à pH 7,4). D'autre part, les germes provenaient de cultures sur bouillon VF non glucosé. Ces émulsions

(2) Nous venons de trouver dans la littérature une confirmation de ce point par une étude de Geiger [8] effectuée sur un autre germe (bacille *Coli*). Cet auteur a constaté que la Streptomycine ne diminue pas la consommation d'oxygène de la bactérie en présence de glucose.

sions furent placées en tube de Thunberg en présence de glucose M/50 et de bleu de méthylène M/6.000 avec et sans Streptomycine (1.000 U. O. par millilitre). La température fut maintenue à 37° C et la vitesse de décoloration fut mesurée. La Streptomycine s'est révélée sans action retardatrice.

Le témoin sans glucose n'est pas décoloré après deux heures tandis que les émulsions contenant du glucose sont décolorées en vingt minutes sans streptomycine, et en dix-sept minutes avec Streptomycine.

*Conclusion.* — La Streptomycine n'inhibe pas les déshydrogénases du métabolisme glucidique.

C. ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LA DISPARITION DES PHOSPHATES MINÉRAUX AU COURS DE LA GLYCOLYSE. — Nous nous sommes contentés, dans une première série d'expériences, de rechercher si la diminution des phosphates minéraux au cours de la fermentation du glucose chez *Clostridium sporogenes*, subissait des modifications par l'addition de Streptomycine.

Les expériences furent réalisées en utilisant des suspensions épaisses de *Clostridium* (poids sec 40 mg. par millilitre). L'incubation en présence de glucose M/10 dura cent vingt minutes à 37°.

Sur le tableau suivant, nous représentons les quantités d'acide phosphorique estérifié en présence de glucose.

TABLEAU III.

	EXPÉRIENCE N° 1	EXPÉRIENCE N° 2
Témoin . . . . .	189 $\mu$ g.	201 $\mu$ g.
Streptomycine 2.000 U.O./ml. . . .	189 $\mu$ g.	228 $\mu$ g.

La Streptomycine n'a donc pas d'influence sur l'intensité totale des phosphorylations au cours de la glycolyse par *Clostridium sporogenes*.

Nous allons rechercher maintenant si la Streptomycine ne modifie pas la nature des transphosphorylations auxquelles le glucose est soumis par le *Clostridium*.

Rappelons qu'en présence de glucose et de phosphates, *Clostridium sporogenes* accumule de l'acide adénosine triphosphorique et un hexosemonophosphate très difficilement hydrolysable (voir notre travail préliminaire [9]).

D. ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LA FORMATION DES DIVERS ESTERS PHOSPHORIQUES AU COURS DE LA GLYCOLYSE. — Nous avons

établi des bilans de phosphorylation du glucose suivant la technique de Lohman (mesure des vitesses d'hydrolyse dans l'acide chlorhydrique N/1 à 100°, des différents esters phosphoriques d'oses).

*On verra d'après l'examen des tableaux suivants que la Streptomycine ne modifie pas la nature des transphosphorylations effectuées par le Clostridium.*

Le tableau IV montre comment sont distribuées, *au sein des cellules*, les différentes fractions glucidophosphoriques, à des instants variables de la glycolyse.

Pour déterminer ces valeurs, après avoir séparé par centrifugation les germes du liquide surnageant, nous les avons soumis à une extraction prolongée par l'acide trichloracétique glacé à 10 p. 100. L'acide phosphorique libre fut dosé par la méthode de Briggs sur une partie aliquote des extraits trichloracétiques.

Les chiffres expriment des *microgrammes* d'acide phosphorique pour la masse de microbes provenant de 5 ml. d'émulsion.

TABLEAU IV. — Bilans des divers types de dérivés phosphoriques après cent vingt minutes à 37°.

	$P_0$	$P_7 - P_0$	$P_{180} - P_7$	$P_T - P_{180}$	$P_T - P_0$
<i>Sans glucose :</i>					
Témoin . . . . .	144	39	45	60	144
Streptomycine 1.000 U.O./ml. . . . .	180	45	90	30	165
<i>Avec glucose :</i>					
Témoin . . . . .	81	120	90	198	420
Streptomycine 1.000 U./ml. . . . .	60	100	120	220	486

$P_0$  représente la quantité d'acide phosphorique libre.

$P_7 - P_0$  indique celle qui apparaît après hydrolyse de sept minutes à 100° C dans  $SO_4H_2$  N/1 (c'est-à-dire celle qui dérive de la totalité de l'A. T. P. et d'une partie (50 p. 100) de l'acide phosphopyruvique, ainsi que d'une très faible partie (7 p. 100) de l'ester de Harden et Young).

$P_T$  est l'acide phosphorique total trouvé après destruction sulfonitrique. Il correspond donc à la somme de : 1° les orthophosphates et l'acide phosphorique des combinaisons glucido-phosphoriques précédemment dosées ; 2° l'acide phosphorique dérivant des esters de Robison et de Cori, des trioses-phosphates ainsi que des combinaisons ribonucléotidiques acidosolubles.



$P_T - P_{180}$  correspond donc à l'ensemble de combinaisons organo-phosphoriques autres que l'A. T. P., l'acide phosphopyruvique, et les esters de Neuberg et de Harden et Young.

$P_T - P_0$  correspond à l'ensemble de tout le phosphore organique.

On voit, d'après le tableau IV, que la Streptomycine, même à des doses très élevées, n'a pas empêché l'accumulation d'A. T. P. et d'hexosemonophosphate par les cellules de *Clostridium* incubées en présence de glucose pendant cent vingt minutes.

Ces conclusions subsistent d'ailleurs si l'on envisage non plus seulement les phosphorylations à l'intérieur de la cellule, mais dans l'ensemble des émulsions (corps microbiens et liquide ambiant) :

TABLEAU V.

	$P_0$	$P_i - P_0$	$P_{180} - P_i$	$P_T - P_{180}$	$P_T - P_0$
Témoin à l'instant initial . . . . .	621	360	339	720	1410
Suspensions + Glucose après 120 minutes . . . . .	450	450	300	840	1620
Suspensions + Glucose + Streptomycine (1.000 U./ml.) après 120 minutes . . . . .	425	500	285	860	1645

En résumé, ce n'est pas sur le métabolisme des glucides que porte l'action inhibitrice de la Streptomycine.

Nous avons vu ci-dessus que la Streptomycine freine la néoformation d'acide phosphorique dans les émulsions microbiennes conservées à la glacière; elle doit donc empêcher la décomposition de certaines combinaisons phosphoriques. Nous allons voir que cette action de la Streptomycine s'explique par le blocage de certaines réactions cataboliques des acides nucléiques.

E. ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LE CATABOLISME DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE. — S. S. Cohen [4] a montré la formation *in vitro* de complexes entre les acides nucléiques et la Streptomycine. Massart, étudiant le complexe acide ribonucléique-Streptomycine a constaté qu'il résistait à l'action de la ribonucléodépolymérase.

Nous avons tout d'abord vérifié les faits annoncés par S. S. Cohen, puis nous avons étudié l'action d'une ribonucléodépolymérase cristallisée (3) sur les complexes formés par de

(3) La ribonucléodépolymérase fut extraite du pancréas de bœuf par la technique de Kunitz [11].

la Streptomycine avec un acide ribonucléique préparé à partir de levure.

Nos résultats [40] confirment ceux de Massart car la combinaison avec la Streptomycine empêche bien l'acide ribonucléique d'être transformé sous l'influence de la nucléodépolymérase en dérivés solubles dans l'acide chlorhydrique M/5. Notre technique diffère de celle de Massart et cependant elle confirme ses résultats.

On pouvait se demander si une telle combinaison, en se formant dans les corps microbiens, n'était pas responsable de l'action antibiotique de la Streptomycine, mais il restait à prouver que la Streptomycine inhibait l'utilisation des acides nucléiques par les bactéries (4).

Nous avons déjà vu [12] que la Streptomycine ralentissait la lyse cellulaire spontanée (autolyse) du *Clostridium* (5). Cette action est indépendante de l'action de l'antibiotique sur les systèmes enzymatiques protéolytiques. En effet, les protéases et les peptidases du *Clostridium* ne sont pas inhibées par la Streptomycine. On pouvait donc penser que la Streptomycine influait sur la lyse cellulaire en agissant sur la lyse des acides nucléiques. Un premier fait a étayé cette hypothèse. La Streptomycine (comme la Pénicilline) ralentit l'utilisation du ribose nucléique. Voici les résultats d'une de nos expériences sur ce sujet. Les chiffres expriment des microgrammes de ribose encore présent à l'état d'acide ribonucléique dans les cellules microbiennes après quatre heures d'autolyse à + 40° C en présence et en l'absence de Streptomycine. Pour le dosage, les cellules étaient épuisées à froid par de l'acide trichloracétique à 10 p. 100 afin d'enlever le ribose libre et les mononucléotides. Les résidus microbiens étaient

TABLEAU VI. — Ribose des acides nucléiques en microgrammes par milligramme de corps bactériens secs.

Témoin au temps zéro . . . . .	32
Témoin sans Streptomycine après autolyse . . . . .	14
Avec Streptomycine (1.000 U./ml) et après autolyse.	26

(4) L'action de la Streptomycine sur le métabolisme nucléique dans les microbes pouvait, d'ailleurs, ne pas être limitée à une protection des acides nucléiques vis-à-vis des dépolymérases. Nous avons, en effet, observé l'action d'un autre antibiotique, la Pénicilline, sur une étape différente du catabolisme nucléique : la lyse des mononucléotides. Nous avons donc étudié l'action de la streptomycine sur cette étape et découvert ainsi une action très intense de la Streptomycine (voir plus loin).

(5) Aux fortes concentrations en streptomycine ce ralentissement de l'autolyse est net. Aux faibles concentrations les phénomènes sont plus complexes.

ensuite épuisés par de l'acide trichloracétique à 6 p. 100 à chaud qui dissolvait les acides nucléiques. Le ribose fut dosé dans cet extrait par la technique de Mejbaum [43].

La disparition autolytique du ribose des acides nucléiques est donc fortement inhibée par la Streptomycine (inhibition de l'ordre de 60 p. 100).

Notons que même en présence de Streptomycine à haute dose, le catabolisme de l'acide ribonucléique n'est pas complètement bloqué. La combinaison de la Streptomycine avec les acides nucléiques selon S. S. Cohen ne suffit donc pas à interrompre totalement la dégradation des acides nucléiques dans la cellule microbienne. Mais l'antibiotique intervient en outre au stade des mononucléotides.

Nous n'avons pas limité en effet notre étude du métabolisme nucléique au catabolisme des polynucléotides et nous avons étudié l'influence de la Streptomycine sur la désintégration de mononucléotides puriques purifiés mis en contact avec des suspensions de *Clostridium* non proliférant.

Pour chacun de ces essais on utilisa 5 ml. d'une émulsion de *Clostridium* dans l'eau physiologique (renfermant 40 mg. de microbes pesés secs par millilitre) et 1 ml. de solution de nucléotides contenant soit 4 mg. d'acide guanylique, soit 5 mg. d'acide adénylique. La dose de Streptomycine utilisée était de 1.000 U. par millilitre. Les liquides étaient saturés en toluène.

Après seize heures d'incubation à 37° et à pH 7,2 (tampon boraté) les émulsions furent défilées par l'acide trichloracétique à 2 p. 100 et, après centrifugation, l'on dosa l'acide phosphorique dans le liquide surnageant.

Dans les tableaux suivants figurent les quantités d'acide phos-

#### Acide guanylique.

	ACIDE PHOSPHORIQUE libéré	GUANINE LIBÉRÉE en µg.
Témoin. . . . .	195	215
Streptomycine . . . . .	73	65

#### Acide adénylique.

	ACIDE PHOSPHORIQUE libéré du nucléotide
Témoin . . . . .	190
Streptomycine. . . . .	40



phorique libérées à partir des nucléotides puriques en microgrammes pour 5 ml. de suspension bactérienne. Dans le cas de l'acide guanylique, nous avons déterminé en outre la quantité de guanine libérée par hydrolyse.

*On voit que la Streptomycine inhibe considérablement la lyse des nucléotides puriques.*

Notons que cette inhibition n'est pas due à la formation de complexes insolubles entre la Streptomycine et les mononucléotides. En effet, nous avons constaté par exemple que la Streptomycine ne donne pas de précipité avec l'acide adénylique ni même avec de l'acide nucléique dépolymérisé par une brève action (cinq minutes) de notre ribonucléodépolymérase cristallisée. C'est seulement lorsque la Streptomycine est mise en présence d'acide nucléique intact (polynucléotides) que se forme le précipité observé par S. S. Cohen.

L'inhibition par la Streptomycine du catabolisme des mononucléotides que nous avons découverte doit intervenir dans l'action antibiotique, mais il est également probable que l'action directe de la Streptomycine sur les polynucléotides découverte par Cohen joue aussi un rôle. Il est impossible de vérifier qu'il se fait bien des complexes insolubles dans le sein des microbes et, d'autre part, la Streptomycine n'inhibe pas totalement la disparition des acides nucléiques microbiens comme le montrent nos études sur le ribose. La Streptomycine doit donc bien intervenir aussi au stade mononucléotide suivant le processus que nous avons découvert.

On sait d'ailleurs que la Streptomycine a un domaine d'action plus vaste que celui de la pénicilline car elle touche de plus nombreuses espèces microbiennes. Il est possible que ceci soit dû au fait qu'elle touche le métabolisme nucléaire en deux points au lieu d'un.

Ici nous tenons à signaler qu'une partie du travail sur la ribonucléodépolymérase a été effectuée avec l'aide de R. Rybak avec qui nous devons publier un mémoire détaillé sur ce sujet.

#### DISCUSSION.

Le mode d'action de la Streptomycine s'apparente à celui de la Pénicilline. En effet, tandis qu'aucun de ces antibiotiques ne manifeste d'action inhibitrice vis-à-vis du métabolisme phosphoglucidique du *Clostridium sporogenes*, tous deux interfèrent avec le catabolisme des combinaisons nucléiques. La Streptomycine, en effet, comme la pénicilline, empêche la déphosphorylation des nucléotides puriques par les *Clostridia* non proliférants (6).

(6) Nous n'avons pas encore étudié le cas des mononucléotides pyrimidiques.

Il est donc logique de s'attendre à ce que la Streptomycine ait des répercussions identiques à celles de la Pénicilline sur le métabolisme général du *Clostridium*.

Nous avons pu constater, en effet [14], que la Streptomycine, comme la Pénicilline, inhibe la réaction de Stickland [15], processus de désamination couplée par oxydoréduction entre deux amino-acides, que met en œuvre le *Clostridium* pour métaboliser les protides.

Or nous avons récemment montré que l'acide adénylique est un facteur très important de la réaction de Stickland [16]. Ceci permet une interprétation de l'inhibition de cette réaction par la Streptomycine.

Deux faits peuvent paraître contradictoires :

1° La Streptomycine protège les mononucléotides en inhibant leur lyse ;

2° La Streptomycine inhibe la réaction de Stickland pour laquelle l'acide adénylique est un activateur.

Ceci nous amène à penser que l'activation de la réaction de Stickland n'est pas le fait de l'acide adénylique, mais d'un de ses dérivés métaboliques. Nous poursuivons des recherches sur ce point.

Nous avons pu constater que si l'on traite les suspensions de *Clostridium* par la ribonucléodépolymérase, la vitesse de la réaction de Stickland est considérablement accrue. L'acide adénylique ayant des effets analogues, on peut interpréter l'action de la ribonucléase sur la réaction de Stickland comme due à la libération de nucléotides à partir de l'acide ribonucléique microbien, car on sait [17] que la ribonucléodépolymérase libère des mononucléotides pyrimidiques à partir des acides nucléiques.

On peut, en somme, penser que le mode d'action de la Streptomycine consiste en deux points :

1° L'inhibition du catabolisme de l'acide ribonucléique, dont la conséquence fondamentale serait de freiner le réapprovisionnement de la cellule en nucléotides essentiels pour certaines réactions métaboliques.

2° Le blocage du catabolisme des nucléotides préexistant dans la cellule, qui renforcerait l'action précédente.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.). Ces Annales, 1948, 74, 362.
- [2] CAVALLITO. J. Biol. Chem., 1946, 164, 29.
- [3] FRIED et WINTERSTEINER. J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 79.
- [4] COHEN (S. S.). J. Biol. Chem., 1947, 168, 511.
- [5] MASSART, PELTERS, VAN HOUCKE. Experientia, 1947, 3, 494.
- [6] WAKSMAN. Proceed. Soc. Exp. Biol. Med. 1948, 67, 279.

- [7] GREEN, ILVERSON, WAKSMAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1948, 67, 285.
- [8] GEIGER. *Arch. Bioch.*, 1947, 15, 227.
- [9] GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1948, 74, 342.
- [10] GROS (F.), RYBAK, MACHEBOEUF (M.) et RAMBECH. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, 226, 1550.
- [11] KUNITZ. *Method. der Ferm. Forsch.*, 1941, 2, 1940.
- [12] MACHEBOEUF (M.). *Bull. Soc. Chim. Biol.* (sous presse).
- [13] MEJBAUM. *Zeitschr. Phys. Chem.*, 1939, 258, 117.
- [14] GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948 (sous presse).
- [15] STICKLAND. *Bioch. J.*, 1934, 28, 1746.
- [16] GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, 226, 1318.
- [17] SCHMIDT et al. *J. Biol. Chem.*, 1947, 168, 204.
- [18] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947, 141, 265.



# RECHERCHES SUR LES AMINOACIDES EXTRACTIBLES PAR L'ACÉTONE PUIS LE MÉTHANOL DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

par DAISY ROBERT et MICHEL MACHEBOEUF.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique.)

M<sup>me</sup> J. Blass et M. Macheboeuf [4] ont montré récemment que les vibrions cholériques livrent abondamment certains acides aminés à l'acétone, puis à l'alcool méthylique. Nous avons étudié de ce point de vue une espèce microbienne différente, pour juger de la généralité du phénomène.

Des cultures de *Salmonella typhimurium* furent effectuées en quantités importantes sur bouillon autolysat de levure à pH 8 à 37° pendant vingt-quatre heures. Les microbes furent récoltés par centrifugation, puis lavés par de l'eau salée à 9 p. 1.000 (trois lavages par 200 cm<sup>3</sup> chaque fois pour 100 g. de microbes peses frais après lavage et essorage). La réaction à la ninhydrine, fortement positive dans la première eau de lavage, diminuait à chaque lavage pour n'être plus qu'à peine perceptible finalement.

## 1° EXTRAIT ACETONIQUE.

Les microbes essorés furent mis à macérer dans neuf fois leur poids d'acétone anhydre. L'eau des microbes abaissa ainsi le titre de l'acétone à 90 p. 100 environ.

Après dix jours, l'acétone fut recueilli et remplacé par de l'acétone à 90 p. 100 qui fut laissé quatre jours en contact. Les solutions acétoniques furent concentrées par distillation sous vide, jusqu'à obtention d'un sirop épais qui fut additionné de 9 volumes d'alcool absolu. Tout se dissout très bien. On ajoute de l'éther tant que cette addition provoque un précipité. Nous savions, par le travail de Blass et Macheboeuf cité ci-dessus que, dans ces conditions, les amino-acides précipitent à peu près quantitativement, tandis que des impuretés restent en solution dans l'éther. Le précipité fut lavé par de l'éther, puis dissous dans 40 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse d'acide sulfurique 0,2 N et l'on ajouta 40 cm<sup>3</sup> d'une solution à 16 p. 100 d'acide phosphotungstique également 0,2 N en acide sulfurique. Le précipité obtenu fut lavé

par une solution à 5 p. 100 d'acide phosphotungstique, puis éliminé, car notre étude ne porte pas sur les amino-acides pluriaminés que précipite l'acide phosphotungstique dans ces conditions.

Dans la solution, l'excès d'acide phosphotungstique ainsi que l'acide sulfurique furent précipités par addition d'un léger excès de baryte. Le précipité fut éliminé après des lavages par de l'eau contenant un peu de baryte.

Les liquides rassemblés furent traités par un courant de  $\text{CO}_2$  en excès, puis concentrés partiellement sous vide afin d'éliminer convenablement l'excès de baryte. La solution débarrassée du carbonate de baryum fut concentrée sous vide jusqu'à très faible volume. Il apparut un petit précipité qui fut séparé et éliminé, car il ne contenait pas d'acide-amino (ninhydrine négative). La solution filtrée fut évaporée à sec sous vide, le résidu pesait seulement 498 mg. pour 160 g. de microbes pesés frais après simple essorage. L'analyse du résidu donne les résultats suivants :

N total p. 100 . . . . .	0,23, soit 0,72 mg. d'azote p. 100 de microbes frais.
Cendres p. 100. . . . .	87
Sodium p. 100. . . . .	25,2
Présence de chlorures	
Absence de phosphore minéral ou organique.	

La réaction de la ninhydrine est seulement très faiblement positive. Par comparaison avec des solutions titrées d'acides-amino, et, en particulier, d'acide aspartique, nous pouvons conclure que la quantité d'azote d'acides-amino présente dans l'extrait correspond tout au plus à 1,2 p. 100 de l'azote total, soit 0,0000085 d'azote aminé pour 100 de microbes. Si l'on calcule, par exemple, en acide aspartique, ceci correspondrait, au maximum, à un dixième de milligramme d'acide aspartique extrait de 100 g. de microbes. Quantité négligeable. Nous trouvons donc, ici, une profonde différence avec les faits observés dans le même laboratoire, par la même technique pour le vibrion cholérique.

## 2° EXTRAIT MÉTHYLIQUE.

Les corps microbiens déjà soumis à l'extraction acétonique décrite ci-dessus, sont mis à macérer dans de l'éther anhydre pendant une semaine (en changeant l'éther après trois jours). L'éther extrait quelques substances dont des lipides, mais il ne dissout pas d'acides-amino. Les microbes sont ensuite placés dans du méthanol absolu où on les laisse quatre semaines en changeant l'alcool trois fois (volume total de méthanol, 3 l.). La solution filtrée est concentrée sous vide jusqu'à sirop. On dilue ce sirop par 30  $\text{cm}^3$  d'acide sulfurique 0,2 N. On agite avec un peu d'éther qui élimine quelques impuretés. La solution aqueuse acide est traitée par l'acide phosphotungstique, puis par la baryte et

enfin par le  $\text{CO}_2$  comme dans le cas de l'extrait acétonique. Tout comme ci-dessus, on élimine un petit précipité qui ne contient pas d'acide-amino (ni d'ailleurs d'azote). La solution finalement obtenue donne fortement la réaction à la ninhydrine. En évaporant, on obtient un résidu pesant 1,21 g., contenant 0,88 p. 100 d'azote total, 54,6 p. 100 de cendres, dont 23 de sodium partiellement à l'état de carbonate, partiellement à l'état de chlorure.

En comparant la teinte fournie par la ninhydrine avec celles données par des solutions titrées d'acides-amino, nous avons pu conclure que la totalité de l'azote présent devait appartenir à des acides-amino, ce qui correspondait à une teneur en acides-amino de l'extrait méthyleux voisine de 11 p. 100, soit, par rapport aux microbes eux-mêmes, 0,8 p. 100 d'acides-amino passant dans l'extrait méthyleux, quantité assez notable.

Nous avons effectué diverses recherches pour nous renseigner sur la nature de ces acides-amino. La recherche du tryptophane fut négative (réaction d'Adamkiewicz). La recherche des acides-amino soufrés fut négative (réaction au plombite de sodium), par contre la réaction de Millon nettement positive révéla la présence d'un peu de tyrosine, que nous avons d'ailleurs pu isoler facilement grâce à sa faible solubilité. Mais la tyrosine ne représente qu'une partie de l'ensemble des acides-amino présents. Pour identifier les autres acides-amino, nous avons opéré par micro-chromatographie sur papier filtre selon une technique dérivée de celle de Synge et Gordon [2].

Mais, pour cette recherche, nous avons dû modifier la technique de fractionnement décrite ci-dessus afin d'éviter l'action de la baryte qui risquait de précipiter certains acides-amino et de les éliminer de notre extrait final.

Dans cette étude, nous sommes partis de 330 g. de microbes (pesés frais après lavage et essorage). Nous les avons épuisés, comme ci-dessus, par l'acétone, puis par l'éther, puis par le méthanol. L'extrait méthyleux fut également traité par l'acide phosphotungstique, mais en solution chlorhydrique 0,2 N. puis, après enlèvement du précipité, l'acide phosphotungstique fut éliminé par épuisement de la solution au moyen d'un mélange à parties égales d'alcool iso-amyleux et d'éther. L'épuisement fut poursuivi jusqu'à ce que ces solvants n'enlèvent plus d'acide phosphotungstique de la solution aqueuse.

La solution fut évaporée sous vide jusqu'à sécheresse, on a repris par un peu d'eau que l'on évapora sous vide, et ainsi trois fois pour éliminer le plus possible l'acide chlorhydrique. Le résidu final fut transvasé avec le moins d'eau possible dans un petit cristalliseur, et on le soumit à une évaporation lente dans le dessiccateur. Il se forma de beaux cristaux de chlorure de sodium qui furent éliminés par filtration et rapide lavage par très peu d'eau.

(On élimina ainsi : 1,3 g. de ClNa. Le sirop épais qui restait pesait seulement 0,23 g.). Au cours de toutes les concentrations, il apparut, naturellement, des cristaux de tyrosine qui furent séparés et lavés pour éliminer le plus possible cet amino-acide déjà identifié. Le sirop final, aussi bien débarrassé que possible du chlorure de sodium et de la tyrosine, fut enfin dissous dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau, la solution servit à la microchromatographie ; tous les témoins furent préparés avec des solutions d'amino-acides ayant une concentration en ClNa identique à celle de la solution étudiée, car ce sel influe sur la mobilité chromatographique de divers amino-acides.

Sur une même bande de papier filtre, nous plaçons chaque fois à même hauteur, trois gouttelettes de volumes identiques (1). La gouttelette médiane était constituée par la solution inconnue et les deux gouttelettes latérales par des solutions témoins contenant des quantités connues d'acides aminés connus.

Le solvant utilisé pour la chromatographie fut du phénol saturé d'eau et contenant 0,3 p. 100 d'ammoniaque. Mais certains résultats furent vérifiés en employant de la collidine saturée d'eau.

Nous avons pu ainsi constater que notre extrait méthylrique contenait seulement, outre la tyrosine déjà décelée ci-dessus, trois amino-acides à doses décelables : l'alanine, l'acide glutamique et la valine. Nous n'avons jamais pu déceler une leucine, ni acide aspartique, ni glycocolle, ni phénylalanine, ni thréonine.

Si la sérine existe, c'est seulement à l'état de trace infime, mais nous ne pouvons pas affirmer son absence, car sa mobilité n'est pas assez différente de celle de l'acide glutamique. Comme nous savons déjà qu'il n'existe ni tryptophane, ni cystine, ni cystéine (voir ci-dessus), nous pouvons conclure que l'extrait méthylrique ne contient, en somme, que des amino-acides bien particuliers. Comme, d'autre part, le vibrion cholérique, dans un travail encore inédit de notre laboratoire, contient dans son extrait méthylrique d'abondantes quantités d'autres amino-acides et, en particulier, de leucine, nous pouvons conclure que nous observons ici une différence biochimique très nette entre deux espèces microbiennes, non seulement du point de vue quantitatif (masse des amino-acides totaux présents dans les extraits), mais aussi du point de vue qualitatif (nature des amino-acides), et ce fait est très intéressant.

Notons, en outre que nous ne trouvons pas ici trace d'un amino-acide inconnu, tel que ceux soupçonnés dans le vibrion cholérique.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Tandis que le vibrion cholérique livre à l'acétone, puis à l'alcool méthylrique des quantités importantes d'amino-acides, *Salmonella*

(1) Gouttelettes mesurées par un même tube capillaire calibré par pesée du liquide écoulé entre deux repères.



*typhimurium* n'en livre pas à l'acétone et en cède peu à l'alcool méthylique. De plus, parmi ceux qu'extrait ce solvant (en dehors des bases hexoniques que nous n'avons pas étudiées ici), nous ne trouvons que quatre amino-acides : tyrosine, acide glutamique, alanine et valine. D'autres, et en particulier des leucines, que l'on trouve en abondance dans le cas du vibrion cholérique, n'existent pas du tout ici.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLASS (J.) et MACHEBOEUF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1915, **221**, 189 et 313.
- [2] BLASS (J.) et MACHEBOEUF (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 903.

## REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DU TÉTANOS CÉPHALIQUE

par V. DE LAVERGNE, J.-R. HELLUY, G. FAIVRE et Ch. HENRY.

En clinique humaine, les formes de tétanos céphalique avec paralysie de la VII<sup>e</sup> ou de la III<sup>e</sup> paire s'observent non exceptionnellement. Au contraire, en expérimentation, c'est de la contraction que la toxine tétanique fait toujours apparaître. Il nous a donc semblé intéressant de reproduire un tétanos céphalique expérimental, nous plaçant dans les conditions mêmes où se produisent les paralysies du tétanos céphalique de l'homme. Notre but était, tout en reproduisant une maladie humaine de type particulier, de mettre en évidence la possibilité de faire apparaître des paralysies chez l'animal, à l'aide de la toxine tétanique. Nous avons fait connaître nos résultats en 1947, au cours de notes successives à la Société de Biologie de Nancy. Nous les rassemblons aujourd'hui. A notre connaissance, du moins, cette reproduction expérimentale n'a jamais été entreprise.

Nos recherches ont porté :

1° Sur les effets de l'injection de toxine tétanique dans la chambre antérieure de l'œil du lapin (paralysie du III). Les expériences de Rehn et Terrien (1) consistent à inoculer de la toxine tétanique « dans le corps vitré » de l'œil du lapin. Elles sont donc toutes différentes des nôtres, comme sont très différents les résultats observés.

2° Sur les effets de la toxine tétanique dans la région jugale du cobaye (paralysie du VII).

Dans toutes ces expériences, nous avons utilisé une toxine tétanique, dont la dose minima mortelle pour un cobaye de 350 grammes était de 1/10.000 de cm<sup>3</sup>.

### I. — EFFETS DE L'INJECTION DE TOXINE TÉTANIQUE. DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'OEIL DU LAPIN (2).

Nous utilisons des lapins gris ou noirs, deux fois seulement, blancs, des deux sexes, d'un poids voisin de 2 kg. Vérification

(1) REHN et P. TERRIEN, *C. R. Soc. Biol.*, 1902, 54, 444.

(2) En rédigeant cet article (avril 1948), nous avons eu connaissance d'un article intitulé : « The action of tetanus toxin on the rabbits iris », de N. Ambache, R.-S. Morgan et G. Payling Wright, paru dans

était d'abord faite de l'état des yeux et de l'égalité des diamètres pupillaires. On instillait alors 1 goutte de cocaïne au 1/100 dans les deux yeux. Puis introduction d'une aiguille montée dans la chambre antérieure de l'œil « droit », en évitant avec soin de léser l'iris ou le cristallin. Pour éviter toute hyperpression on retirait une quantité d'humeur aqueuse au moins égale à celle que l'on allait injecter. L'animal doit être soigneusement immobilisé, pour éviter, surtout au moment de la traversée de la cornée, et aussi vers la fin de l'injection, les soubresauts qui entraîneraient un traumatisme de l'œil.

Pour apprécier les modifications de la pupille consécutives à l'injection, nous avons mesuré le diamètre des deux pupilles, avant et pendant l'expérience, avec l'excellent « pupillomètre » du professeur Thomas. Lorsque l'inégalité était légère et incertaine, nous instillions dans les deux yeux, éserine ou cocaïne, ou atropine, pour exagérer l'inégalité et, mieux, mettre en évidence un léger myosis ou une légère mydriase, incertaine sans cette épreuve.

A. EFFETS DE L'INJECTION DE FORTES DOSES DE TOXINE DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'OEIL DU LAPIN. — Nos expériences et nos résultats sont rapportés dans le tableau ci-après (tableau I).

Comme on le voit, dans tous les cas, un myosis serré fait immédiatement suite à l'injection de toxine. Il est d'autant plus net qu'une instillation de cocaïne a été pratiquée dans les deux yeux, provoquant une mydriase bilatérale. L'apparition d'un myosis serré du côté injecté est donc d'autant plus manifeste. La durée de ce myosis est d'environ douze à vingt heures. Après vingt-quatre heures, une mydriase, souvent intense, a succédé au myosis ; cette mydriase subsiste longtemps, en moyenne soixante jours ; quelques-uns de nos animaux n'ont pas été suivis au delà du quarantième jour (lapin 33) ou du trentième (lapins 34 c et 16). L'un d'eux (16 b) ne fut plus observé au quatrième jour. Le retour de la mydriase à la normale se fait graduellement, insensiblement, avec lenteur.

Cette mydriase secondaire (puisque précédée d'une brève période de myosis) est durable. Traduit-elle une paralysie du III ? L'épreuve des collyres, dont la valeur, discutée, nous le savons, par certains physiologistes et neurologistes, et cependant assez généralement admise, semble le montrer. Comme il est indiqué sur le tableau I, de semblables résultats ont été obtenus chez les

*The Journal of Physiology*, 1<sup>er</sup> janvier 1948, **107**, 45. Ce travail, conçu et exécuté par des physiologistes, dans un esprit et avec des méthodes qui diffèrent des nôtres, signale, lui aussi, qu'une mydriase succède à l'injection de toxine tétanique, attribuée à une paralysie des terminaisons nerveuses cholinergiques du nerf oculo-moteur.

TABLEAU I. — Effets de l'injection de doses maxima de toxine tétanique dans la chambre antérieure de l'œil.

NUMÉROS des lapins	QUANTITÉ de toxine exprimée en dose m. m.	EFFETS OBSERVÉS		DURÉE	PARALYSIES ASSOCIÉES
		après 30 m.	après 24 h.		
1	2.000	m	M	50 j.	Rétrécissement de la fente palpébrale. Parésie de la membrane nictitante.
10	1.500	m	M	70 j.	
15	1.000	m	M	60 j.	Rétrécissement de la fente palpébrale. Parésie nictitante.
16	1.000	m	M	30 j. et +	Rétrécissement de la fente palpébrale.
16 b.	1.000	m	M	4 j. et +	Observé 4 j. seulement.
16 c.	1.000	m	M	50 j.	
30	2.000	m	M	dcd 3 j.	Kératite traumatique. Tétanos généralisé. Exophtalmie. Rétrécissement de la fente palpébrale.
31	1.300	m	M	cd 3 j.	Idem.
32	1.200	m	M	dcd 3 j.	Idem.
33	1.000	m	M	40 j. et +	Rétrécissement de la fente palpébrale. 2 j. Parésie nictitante. 4° j. Atteinte œil gauche. 6° j.
34 c.	1.000	m	M	30 j. et +	Rétrécissement de la fente palpébrale. Parésie nictitante.

Abréviations : dose m. m., dose minima mortelle ; m, minute ; m, myosis ; M, mydriase ; j, jour ; dcd 3 j., mort le 3° jour.

lapins 1, 10, 34 c, 16 b et 16 c : l'instillation de cocaïne des deux côtés, pendant toute la période de mydriase, provoque du côté « droit » (en expérience) une exagération de la mydriase et, du côté témoin, une mydriase banale. La cocaïne continue donc à exciter le sympathique et à provoquer sa réponse. L'instillation d'ésérine diluée (pratiquée à distance de l'effet de la cocaïne) ne produit, à droite, aucune modification de la mydriase, cependant que la pupille gauche devient punctiforme. Cette absence d'excitation de la III<sup>e</sup> paire par l'ésérine signe la *paralysie du moteur oculaire commun*.

De plus, chez les animaux 1, 15, 30, 31, 32, 33, 34 c, 16, nous avons observé un certain nombre de phénomènes associés à la paralysie du sphincter irien : rétrécissement de la fente palpébrale et enophtalmie, l'un et l'autre très fréquents ; on constate aussi très souvent une paralysie de la membrane nictitante, qui se manifeste par une disparition ou une paresse du réflexe de balayage



cornéen au contact. Le lapin 33 nous offrit même à observer, du sixième au douzième jour, un rétrécissement de la fente palpébrale et une parésie de la nictitante du côté gauche (témoin), en même temps qu'à droite ; mais ce fait est resté unique. Or, l'orbiculaire des paupières et la membrane nictitante du lapin sont innervés par le moteur oculaire commun. Les symptômes que nous avons observés, venant s'ajouter à la mydriase, confirment qu'il s'agit bien d'une atteinte paralytique de la III<sup>e</sup> paire.

Il est remarquable que l'injection de fortes doses de toxine tétanique dans la chambre antérieure de l'œil du lapin ne provoque pas de tétanos généralisé : le tétanos reste céphalique. Dans 3 cas, cependant (lapins 31, 30 et 32), un tétanos général mortel a succédé à l'injection. Dans chacune de ces expériences, il y eut incident technique avec kératite traumatique et infiltration partielle de la cornée par la toxine. Les animaux présentaient, à la trente-sixième heure, une rigidité des oreilles, droites et comme cartonnées ; puis, il y eut généralisation des contractures et mort, en même temps que le développement de la kératite rendait impossible toute observation de l'œil.

Pour trouver une explication à cette absence de généralisation du tétanos, lorsque la toxine est injectée dans la chambre antérieure, à une dose qui, injectée sous la peau, donne un tétanos généralisé, nous avons procédé aux expériences suivantes : dix heures après l'injection de toxine dans la chambre antérieure, nous avons retiré 0,15 cm<sup>3</sup> de l'humeur aqueuse de cette même chambre antérieure, et nous les avons inoculés à la patte d'une souris. Elle prit le tétanos ; de même, vingt-quatre heures après ; par contre, après quarante-huit heures, la souris ne prit pas le tétanos. Par conséquent, la toxine tétanique injectée dans la chambre antérieure reste libre pendant au moins vingt-quatre heures ; elle se résorbe avec une très grande lenteur. Peut-être peut-on trouver là une explication à ce que le tétanos reste local.

*En conclusion* : de fortes doses de toxine injectées dans la chambre antérieure de l'œil du lapin déterminent immédiatement un myosis d'une durée brève, d'environ vingt-quatre heures. Une mydriase lui succède qui subsiste pendant une soixantaine de jours. Cette mydriase, qui s'accompagne d'autres phénomènes locaux, traduit une paralysie de la III<sup>e</sup> paire. La toxine injectée par cette voie reste en partie libre, au moins vingt-quatre heures.

**B. EFFETS DE L'INJECTION DE DOSES DÉCROISSANTES DE TOXINE DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'ŒIL DU LAPIN.** — Ayant constaté ce que détermine régulièrement l'injection de fortes doses de toxine tétanique, nous avons procédé à l'injection de doses décroissantes. Le tableau II donne le résumé de nos expériences et de nos résultats.

TABLEAU II. — Effets de l'injection de doses décroissantes de toxine T, dans la chambre antérieure de l'œil.

NUMÉRO des lapins	QUANTITÉ de toxine exprimée en dose m. m.	EFFETS OBSERVÉS		DURÉE	OBSERVATIONS
		après 30 m.	après 24 h.		
12	30	m	m	30 j.	Mydriase le 3 <sup>e</sup> jour.
3	10	m	M	21 j.	
38 c.	40	m	M	25 j.	
38 b.	10	m	M		Œil infecté, n'a pu être suivi.
38	2,4	m	M	65 j.	
34	1	m	M	34 j.	
36	1	m	m		Mydriase le 3 <sup>e</sup> jour. Hippus pendant 48 heures.
29	0,1	m	M	21 j.	
35	0,1	m	m	20 j.	

Avec des doses allant de 0,3 cm<sup>3</sup> au 1/100 à 0,1 cm<sup>3</sup> au 1/1.000 d'une toxine active au 1/10.000 pour le cobaye, nous obtenions régulièrement chez le lapin une mydriase paralytique contrôlée par l'épreuve des collyres. La durée de cette mydriase est, dans l'ensemble, moins longue que celle du tableau I : de vingt et un à trente jours ; chez un seul, de soixante et un jours (lapin 38).

Aux doses plus faibles de 0,1 cm<sup>3</sup> à 1/1.000, les phénomènes observés sont moins nets. On assiste à une phase qui semble témoigner d'une incertitude réactionnelle, une oscillation du myosis à la mydriase : chez le lapin 36, un hippus pupillaire a précédé l'installation de la mydriase ; chez le lapin 34, une mydriase s'est installée d'emblée. Il se peut que ces variations soient dues à une légère différence de la quantité de toxine injectée.

Enfin, à la dose de 0,1 cm<sup>3</sup> d'une dilution à 1/10.000 (1/10 de D.M.M. chez le cobaye), mêmes phénomènes oscillants (myosis, mydriase) chez le lapin 29. Par contre, chez le lapin 35, s'installe d'emblée un myosis persistant vingt jours et plus. L'épreuve des collyres montre qu'il s'agissait bien d'un phénomène de contraction : mydriase égale des deux côtés après cocaïne, excitant le sympathique qui répond ; myosis intense de l'œil témoin, et non du côté injecté, après éserine : il s'agit donc bien d'un myosis par contraction.

*En conclusion*, les doses moyennes de toxine, injectées dans la chambre antérieure, provoquent une mydriase secondaire et durable comme l'injection de fortes doses. A doses faibles, les effets de l'injection sont moins nets et de tendance oscillatoire contraire (myosis, mydriase). A dose très faible (1/10 de la D.M.M.), nous avons obtenu chez un animal un myosis par contraction de la III<sup>e</sup> paire.

C. EFFETS D'INJECTIONS TÉMOINS. — Pour se rendre un compte exact de ce qui revient à l'action propre de la toxine tétanique injectée dans la chambre antérieure de l'œil, il était nécessaire de procéder, par la même voie, à des injections d'autres substances que la toxine tétanique.

Le tableau III montre les résultats obtenus par injections témoins.

TABLEAU III. — Effets d'injections témoins dans la chambre antérieure de l'œil du lapin.

NUMÉROS des lapins	NATURE DU LIQUIDE INJECTÉ dans l'œil droit	EFFETS OBSERVÉS		DURÉE
		après 30 m.	après 24 h.	
2	0,2 toxine chauffée 120°, 25 minutes.	m	m	8 j.
2 b	0,1 toxine pure chauffée 80°, 60 minutes.	m	m	8 j.
44	0,1 toxine pure chauffée 80°, 60 minutes.	m	m	11 j.
19 c	0,1 toxine pure chauffée 120°, 15 minutes.	m	m	8 j.
40	0,1 toxine pure chauffée 120°, 20 minutes.	m	m	10 j.
13	0,1 toxine 1 % chauffée 120°, 15 minutes.	m	m	10 j.
17	0,1 toxine 1 % chauffée 120°, 15 minutes.	m	m	10 j.
37 b	0,1 toxine 1/500 chauffée 120°, 15 min.	m	hippus.	20 j.
20	0,15 anatoxine tétanique.	m	m	8 j.
18	0,15 bouillon ordinaire.	m	m	10 j.
38 b	0,15 bouillon ordinaire.	m	m	10 j.
21	Piqûre simple, sans injection de liquide.	m	m	10 j.

Nous avons donc injecté dans la chambre antérieure, soit de la toxine chauffée à 120°, pendant vingt-cinq minutes ou à 80° pendant une heure, et à degrés de dilutions variés, soit de l'anatoxine tétanique, soit du bouillon servant à la préparation de la toxine tétanique. Nous nous sommes contentés de pratiquer une ponction simple de la chambre antérieure.

Il est assez remarquable qu'un résultat sensiblement identique ait été obtenu après toutes ces interventions : c'est toujours un myosis qui se produit, immédiat, et qui dure en moyenne dix jours, avant de céder et de laisser une pupille dont le diamètre soit égal à celui de l'autre œil.

Ce myosis « traumatique », d'une durée d'une dizaine de jours, permet de mieux apprécier ce qui se passe quand on injecte de la toxine tétanique. Dans ce dernier cas, nous l'avons vu, on note une première période de myosis ; elle correspond au myosis traumatique. Mais elle fait place à la mydriase vers la vingtième heure, ce qui correspond à la période d'incubation nécessaire (comme dans tous les cas) pour que la toxine exerce son action, qui est, ici, paralytique. De plus, jamais, avec les injections

témoins, on n'obtient de mydriase secondaire et prolongée, qui semble donc bien correspondre à l'effet propre de la toxine tétanique.

Enfin, le myosis « persistant » obtenu chez un animal par l'effet de faibles quantités de toxine, semble bien traduire une « contracture » due à la toxine, puisque, avec les injections témoins, on n'obtient jamais qu'un myosis de brève durée.

*En conclusion :* L'injection dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, de toxine chauffée, d'anatoxine ou de bouillon simple, ou la simple ponction de cette chambre, provoquent un myosis immédiat et d'une durée de dix jours environ, qui n'est jamais suivi d'une mydriase secondaire et prolongée. Ceci ne s'observe qu'avec la toxine tétanique.

D. EFFETS DE L'INJECTION DE TOXINE CHEZ LES ANIMAUX IMMUNISÉS. — Pour contrôler de façon supplémentaire la spécificité de l'action mydriatique de la toxine tétanique injectée dans la chambre antérieure, nous avons préparé une deuxième série d'animaux témoins, à qui du sérum antitétanique avait été inoculé sous la peau, vingt-quatre ou quarante-huit heures avant l'injection de toxine dans la chambre antérieure.

Nos résultats sont rapportés dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Effets de l'injection de toxine tétanique dans la chambre antérieure de l'œil du lapin préalablement immunisé.

NUMÉROS des lapins	QUANTITÉ de toxine exprimée en d. m. m.	QUANTITÉ de sérum injectée	EFFETS OBSERVÉS		DURÉE	OBSERVATIONS
			après 30 m.	après 24 h.		
43	10	3 000 U.	m	m	30 j.	Lapin de 1 kg. 500.
14	10	1.500 U.	m	m	21 j.	
46	10	300 U.	m	m	10 j. et +	
47	10	150 U.	m	M	8 j. et +	
22	1.000	3.000 U.	m	m	32 j.	N'a pas été observé au delà de 6 j.
3	1.000	1.500 U.	m	m	6 j.	
23	1.000	1.200 U.	m	m	19 j.	
45 c	2.000	1.500 U.	m	m	25 j.	
42	1.000	300 U.	m	M	20 j. et +	
24	1.000	300 U.	m	M	30 j.	

On y voit que chez les lapins passivement immunisés au préalable par une injection sous-cutanée de sérum antitétanique, la toxine a déterminé, le plus souvent, un myosis persistant non suivi de mydriase, et quelquefois un bref myosis suivi de mydriase persistante.



La raison de cette différence tient à la quantité de sérum inoculée.

Chez les lapins ayant reçu une forte dose de sérum, (de 300 U.A. à 0,75 pour 1 D.M.M.), on observe un myosis durant environ trois à quatre semaines ; par contre, 2 des 3 lapins à mydriase secondaire avaient reçu une faible dose de sérum (300 U.A. pour 1.000 D.M.M.). Le 3<sup>e</sup>, il est vrai (lapin 47), est plus difficile à interpréter.

Nous retrouvons donc ici les faits classiques apportés par Roux et Vaillard, par Morax, établissant que l'antitoxine injectée sous la peau « passe » dans l'humeur aqueuse, mais ne passe que partiellement. C'est pourquoi, chez les lapins ayant reçu de fortes doses de sérum (de 300 à 0,75 U.A. pour 1 D.M.M.), assez d'antitoxine passait dans l'humeur aqueuse pour neutraliser la toxine et empêcher la mydriase : on n'observa que du myosis. Au contraire, chez les 2 lapins ayant reçu 300 U.A. pour 1.000 D.M.M., le passage de l'antitoxine dans l'humeur aqueuse était insuffisant pour neutraliser la toxine, d'où apparition d'une mydriase secondaire comme chez les animaux neufs.

On peut cependant faire deux remarques : d'abord, que chez les lapins à mydriase secondaire, celle-ci fut d'une durée moins longue que chez les non immunisés (comme si ébauche de neutralisation) ; ensuite que chez les lapins ayant reçu de fortes doses de sérum, le myosis dura plus longtemps qu'on ne l'observe après simple traumatisme. Là encore, on peut se demander si la neutralisation n'aurait pas été un peu incomplète, laissant subsister une trace de toxine, laquelle aurait provoqué une contracture persistante de l'iris, comme nous l'avons observé, avec de très faibles doses de toxine, chez les animaux du tableau II.

*En conclusion.* — Lorsque l'injection de toxine est faite dans la chambre antérieure de l'œil de lapins ayant préalablement reçu sous la peau une quantité « suffisante » d'antitoxine tétanique, on n'observe plus la mydriase secondaire, constante chez les lapins non immunisés.

## II. — EFFETS DE L'INJECTION DE TOXINE TÉTANIQUE DANS LA RÉGION JUGALE DU COBAYE.

L'injection de toxine tétanique dans la région jugale du cobaye détermine l'apparition d'une asymétrie faciale. L'aspect de celle-ci dépend de deux facteurs inégalement importants : la quantité de toxine injectée et le lieu de l'injection.

D'une façon générale, deux types opposés peuvent être décrits :  
*Premier type : Paralysie faciale.* — Après vingt heures d'incubation environ, on note, du côté infecté, un affaissement apparent

de l'hémiface, dont les poils sont couchés. La fente palpébrale est rétrécie, il existe une légère énophtalmie et le contact de la cornée avec un instrument ne provoque pas l'occlusion palpébrale réflexe. L'oreille est aplatie, tombante, l'orifice narinaire est béant, immobile comme l'hémimuseau du même côté, alors que le côté opposé continue à palpiter rythmiquement avec la respiration. Les moustaches sont tombantes, l'hémimuseau est dévié, choit vers le côté injecté et la lèvre supérieure découvre l'incisive supérieure ; la lèvre inférieure est affaissée et inclinée vers le bas du même côté.

Les excitations extérieures (claquement de mains par exemple)



FIG. 1. — Paralyse faciale gauche.

qui provoquent des contractions réflexes du côté sain accentuent la dissymétrie et accusent l'immobilité de l'hémimuseau paralysé.

*Deuxième type : contracture faciale.* — Au bout du même temps d'incubation apparaissent des signes sensiblement inverses des précédents. Les poils et moustaches de l'animal ne sont pas affaissés, l'occlusion de l'œil est plus marquée, mais il réagit en se fermant à l'excitation de la cornée. L'oreille est redressée « en crête » et, comme les oreilles des lapins tétaniques, donne l'impression d'être cartonnée.

De face, les orifices narinaires sont inégaux. Du côté injecté la narine est plus petite, ses palpitations respiratoires persistent mais sont moins amples. L'hémimuseau est attiré vers le haut et vers l'oreille du côté injecté. La lèvre supérieure apparaît plus élevée. L'ensemble des signes révèle nettement la contracture

qui est encore plus évidente à l'excitation, celle-ci provoquant de véritables spasmes, avec occlusion de l'œil.

Cette « clinique » du cobaye était faite d'analogies avec, d'une part, la paralysie faciale, et d'autre part, la contracture faciale de l'homme.

Cependant, dans un certain nombre de cas, des difficultés d'interprétation naissaient, surtout avec les doses moyennes de toxine ; dans ce cas, au début de l'installation des symptômes, on observait alors un mélange de paralysie et de contracture, rendant aléatoire la classification des signes dans l'un ou l'autre cadre. Le sens des déviations latérales était particulièrement discutable parfois, par suite de l'existence chez le cobaye du sillon inter-narinaire, qui tempère l'asymétrie.

C'est pourquoi : 1° il nous parut indispensable de fixer l'aspect type de la paralysie par section chirurgicale du facial chez le cobaye neuf. L'aspect du museau et de l'œil de l'animal après cette section se montra exactement superposable au type paralytique plus haut rapporté.

2° La section de la VII<sup>e</sup> paire chez des animaux ayant reçu une dose paralytique de toxine tétanique ne modifie en rien la déviation du museau ; lorsqu'il existe un mélange de contracture-paralysie, elle exagère la chute de la lèvre.

3° La section de la VII<sup>e</sup> paire chez les cobayes ayant reçu une dose contracturante de toxine provoque, par contre, une paralysie qui inverse la déviation du museau. Les lèvres supérieures et inférieures tombent, l'œil s'ouvre grand et aucune excitation ne provoque plus l'occlusion.

Cette façon de procéder, pour intéressante qu'elle fut, présentait cependant l'inconvénient de créer des lésions irréversibles ne permettant plus l'observation ultérieure des animaux. Aussi étions-nous conduits à rechercher une autre épreuve provoquant les mêmes effets, mais passagers.

La novocaïne (1 cm<sup>3</sup> pour un cobaye de 350 g.) injectée à l'émergence stylo-mastoïdienne du facial détermine en une minute une paralysie faciale typique, transitoire, chez l'animal neuf. La durée de cette paralysie fonctionnelle est de vingt minutes environ.

L'utilisation de ce test fut particulièrement précieuse. Comme la section, la novocaïne inversait la dissymétrie en cas de contracture et laissait identique la dissymétrie paralytique. Il permit de préciser à tout instant le caractère de la déviation.

Le lieu de l'injection de la toxine n'était pas non plus dépourvu d'intérêt.

De 3 cobayes, l'un reçut 1 goutte de toxine au 1/50 (en injection intradermique afin d'éviter la diffusion du liquide) au niveau de l'oreille, à 5 mm. au-dessous de celle-ci.

Le deuxième, de la toxine au  $1/50^e$  dans les mêmes conditions, à égale distance de l'œil et de la narine ; le troisième, de la



FIG. 2. — Cobaye normal.



FIG. 3. — Contracture faciale droite.

toxine à  $1/50$ , dans la lèvre supérieure à 5 mm. de la narine.

Le cobaye 1 présenta des signes « postérieurs » avec paralysie



TABLEAU V. — Effets de l'injection de toxine tétanique dans la région jugale du cobaye.

NUMÉROS des cobayes	TOXINE employée dilution	EFFETS OBSERVÉS				
		après 1 j.	après 2 j.	après 3 j.	après 4 j.	après 10 j.
3 . . . . .	0,25 cm <sup>3</sup> pure.	P M				
42 . . . . .	»	P M				
43 . . . . .	»	C P M				
52 c . . . . .	»	P M				
2 . . . . .	1/10	P	P	M		
22 . . . . .	»	P	S 7	M		
23 . . . . .	»	C P	M			
26 . . . . .	»	C P	M			
27 . . . . .	»	C P	M			
28 . . . . .	»	C	P M			
34 . . . . .	»	C P	M			
35 . . . . .	»	C	P M			
37 . . . . .	»	P	M			
39 . . . . .	»	C	C P	M		
24 . . . . .	1/50	C P	P	M		
29 . . . . .	»	C	P	M		
30 . . . . .	»	C	P	M		
52 . . . . .	»	C P	P	M		
21 . . . . .	1/100	C	C	S 7		
25 . . . . .	»	C	C	M		
31 . . . . .	»	C	C P	P M		
40 . . . . .	»	C		M		
41 . . . . .	»	C		M		
45 . . . . .	»	C		M		
46 . . . . .	»	C		M		
47 . . . . .	»	C P	P	M		
51 . . . . .	»	C P	C P	P M		
33 . . . . .	1/500	P C	P	M		
47 b . . . . .	»	C	P	M		
49 . . . . .	»	C	C P	P M		
50 . . . . .	»	C	C P	M		
19 . . . . .	»	C	C	? 7		
20 . . . . .	»	C	C	S		
1 . . . . .	1/1.000	C		C	M	
14 . . . . .	»	C		C	M	
37 b . . . . .	»	C		C	M	
38 . . . . .	»	C		C	?	
18 . . . . .	»	C		C	?	
18 . . . . .	»	C		C	M	
17 . . . . .	1/10.000	C		C		18 j.
14 . . . . .	»	C		C		20 j.
13 . . . . .	»	C		C		M ?
15 . . . . .	»	C		C		M 10 j.
16 . . . . .	»	C		C		M 12 j.

Abréviations employées : C, contracture; P, paralysie; C P, mélange de paralysie et de contracture; M, mort; S 7, section du nerf facial; d m m, dose minima mortelle; j, jour.

de l'oreille, du cou, lathérothonos, et à peu près pas de déviation du museau.

Le cobaye 2 présenta une symptomatologie paralytique « postérieure » et antérieure.

Le cobaye 3 montra surtout des signes antérieurs du museau avec asymétrie buccale maxima, l'oreille restant sensiblement normale.

Nous conservâmes, en conséquence, pour les injections suivantes, la technique n° 2.

Le tableau V rapporte nos résultats observés sur cobayes ayant reçu par voie intradermique, dans la région jugale, 0,25 cm<sup>3</sup> de dilutions variées d'une toxine active à 1/10.000 pour un cobaye de 350 g. Nous avons été contraints d'utiliser des cobayes qui n'étaient pas tous de même poids (de 500 à 250 g.), ce qui explique de légères divergences dans les résultats pour une même dose.

Des faits observés, il résulte que c'est la quantité de toxine injectée dans le derme de la région innervée par le facial, qui détermine l'apparition, soit de la paralysie, soit de la contracture. A dose forte, paralysie ; à dose moyenne, contracture.

Il nous paraît important de faire remarquer : 1° qu'à doses faibles, on obtient une dissymétrie par contracture, d'un type pur ; 2° qu'à doses fortes, on observe d'abord une phase de contracture, puis une phase secondaire de paralysie. Et aussi que, d'ordinaire, quelques symptômes de contracture apparaissent à côté des signes de paralysie. C'est ce que démontre dans ces cas, la section du facial ou la novocaïsation, qui ne modifient pas le sens de la dissymétrie par paralysie, mais la rendent plus complète, en faisant disparaître les signes de contracture associée. Ce mélange, on le sait, s'observe assez souvent chez l'homme.

Nous n'avons pas indiqué sur ce tableau que 2 cobayes, qui avaient précédemment reçu une injection de sérum antitétanique, n'ont présenté aucun trouble.

*En conclusion :* L'injection expérimentale de toxine tétanique dans la zone d'innervation du facial, provoque, chez le cobaye, tantôt une contracture, tantôt une paralysie. A doses fortes, paralysie ; à doses faibles, contracture. L'une et l'autre se succèdent à doses fortes, et elles sont souvent associées.

Ainsi, la toxine tétanique, injectée dans le domaine du III comme du VII, peut provoquer des paralysies. De même que chez l'homme, elle produit, dans les mêmes conditions, une forme paralytique de tétanos céphalique.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'OLÉOLYSE TUBERCULEUSE ROLE DES PROTÉINES DU BACILLE DE KOCH

par V. KÜRTI.

(Institut Pasteur. Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose,  
et Institut de Physiologie clinique de l'Université Charles de  
Prague. Directeur : professeur J. SKLADAL.)

En étudiant l'action bactéricide *in vitro* sur le bacille de Koch des huiles phénoliques — chimiquement constituées par des éthers phénoliques contenant ou non un groupement phénol libre —, nous avons pu constater que ces huiles se comportent, vis-à-vis de l'oléolyse tuberculeuse, d'une manière différente selon leur composition. Cette notion introduit un élément nouveau dans la question.

J. Solomidès [1] a démontré qu'il existe plusieurs huiles (huiles d'arachide, d'olive, de paraffine, de foie de morue, etc.) qui, mises en contact avec le bacille de Koch, particulièrement en culture sur pomme de terre glycéinée, possèdent la propriété oléolytique : les colonies rugueuses du type bovin et humain deviennent macroscopiquement lisses et forment un enduit crémeux. Microscopiquement, on constate, avant tout, que les bactéries perdent progressivement leur acido-résistance.

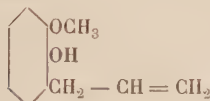
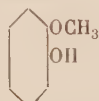
Or, S. et E. Mudd [2] ont trouvé que, seules, les bactéries acido-résistantes, par suite de leur constitution, se laissent mouiller par les huiles. Il s'agirait donc surtout d'une action physico-chimique. Cet effet, dans lequel la composition de l'huile oléolytique joue un grand rôle, n'a été constaté, jusqu'ici, que pour les souches vivantes [1], les souches tuées par chauffage ne montrant aucun changement macroscopique après l'action des huiles. C'est pourquoi on jugea [1] que la lipase des bacilles vivants était nécessaire pour obtenir l'action oléolytique.

\*  
\* \*

Au cours de nos expériences, nous nous sommes servi de la réaction au tellurite de potassium [3] pour contrôler l'action bactéricide des substances utilisées. Cette réaction consiste à mettre en contact un fragment de voile de bacille vivant durant un temps

déterminé avec la solution de tellurite de potassium ( $K_2TeO_3$ ) à 1/1.000. Après vingt-quatre heures d'étuve, le fragment de voile devient noir si les bacilles sont vivants ; il reste blanc si les bacilles sont morts.

Nos recherches, faites avec l'*eugénol* et le *gaïacol*, constitués par des éthers phénoliques qui contiennent un groupement phénol libre, ont démontré que, mis en contact avec ces huiles, les bacilles de Koch présentent un changement de teinte immédiat : le voile devient blanc. On peut constater, en même temps, que les bacilles

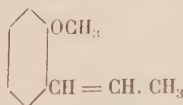
*Eugénol.*Ether méthylique  
de l'allylpyrocatechine.*Gaïacol.*Ether méthylique  
de la pyrocatechine.

sont tués presque immédiatement. L'épreuve au tellurite de potassium concorde sur ce point avec l'inoculation aux animaux, mais les bacilles gardent leur acido-résistance. De même, en mettant en contact ces huiles avec une souche rugueuse du type bovin ou humain, cultivée sur pomme de terre et sur milieu de Löwenstein, *on ne constate pas d'oléolyse notable*. D'autre part, ces huiles, mises en contact avec le sérum humain et le blanc d'œuf, précipitent immédiatement, ce qui témoigne de la dénaturation de ces protéines.

*Cette action dénaturante est due au groupe phénolique toxique.*

\*  
\*\*

Examinons maintenant les résultats obtenus avec les composés huileux semblables, mais ne possédant pas de groupe phénolique libre. Nous avons pris comme exemple l'anéthol.

Ether méthylique  
du parapropylènephénol.

Lorsqu'on ajoute cette huile au sérum humain, on n'obtient aucune précipitation des protéines. Mais lorsqu'on met au contact de cette huile une souche rugueuse du type bovin ou humain sur pomme de terre, on observe aussitôt que la culture devient blanche et, simultanément, on constate un pouvoir oléolytique très fort et très rapide. Après une semaine, la souche devient tout à fait lisse et crémeuse.



L'étude successive dans le temps des suspensions bacillaires dans l'anéthol ou des cultures sur pomme de terre additionnées de 1 cm<sup>3</sup> d'anéthol, montre les faits suivants :

a) MACROSCOPIQUEMENT.

*Après cinq minutes de contact* entre l'anéthol et les bacilles, si ceux-ci sont transplantés dans la solution de tellurite de potassium, ils deviennent noirs, ce qui indiquerait qu'ils sont vivants.

*Après vingt à trente minutes de contact* avec l'anéthol, les bacilles en contact avec le tellurite sont *presque blancs*.

*Après quarante minutes de contact* avec la même substance, les bacilles mis en suspension dans le tellurite *deviennent blancs*.

*Après une semaine de contact* avec l'anéthol introduit dans une culture sur pomme de terre, la culture mise en suspension dans le tellurite *devient blanche*.

Donc, les bacilles meurent après ces délais de contact avec l'anéthol. Par ailleurs, leur repiquage sur milieu de Löwenstein reste stérile.

b) MICROSCOPIQUEMENT.

*Après cinq minutes de contact* des bacilles avec l'anéthol, on constate que ces bacilles, colorés au Ziehl-Neelsen, gardent leur acido-résistance.

*Après vingt-trente minutes de contact* avec la même substance, presque tous les bacilles sont dépourvus de leur acido-résistance.

*Après une semaine de contact* avec l'anéthol, on constate que les cultures de bacilles tuberculeux sur pomme de terre perdent à peu près entièrement leur acido-résistance.

Les effets macroscopiques et microscopiques se produisent plus lentement avec des souches jeunes et vigoureuses qu'avec des souches atténuées, comme, par exemple, le BCG (obligeamment mis à notre disposition par M. van Deirse). Avec ce dernier bacille, l'action est extrêmement rapide, la perte de sa vitalité est consommée en quelques minutes (après trente minutes de contact direct du voile avec l'anéthol et après trois jours et demi de contact, dans le cas de cultures sur pomme de terre) ; la perte progressive de l'acido-résistance est acquise en deux jours.

Nous avons également essayé l'action lytique de l'anéthol sur les bacilles tués par la chaleur à 120°. Nous avons introduit 1 cm<sup>3</sup> d'anéthol suivant la technique indiquée par J. Solomidès [4] dans les cultures de bacilles tuberculeux d'aspect rugueux sur pomme de terre, préalablement tués par la chaleur à l'autoclave (120° durant une demi-heure).

Nous n'avons pas constaté de changement appréciable dans l'aspect macroscopique de ces cultures. Cependant, si nous intro-

duisons ces bacilles tués par autoclavage dans un tube à essai contenant de l'anéthol et que nous laissons agir cette substance pendant huit à dix jours à 37°, nous pouvons constater que la suspension bacillaire devient jaunâtre au niveau de la surface de contact avec l'anéthol. Les bacilles commencent alors à perdre en partie leur acido-résistance (coloration Ziehl-Neelsen), mais cette perte de leur acido-résistance reste partielle même après un délai d'observation de quatre semaines environ.

De même, nous avons introduit dans des cultures sur pomme de terre 1 cm<sup>3</sup> de solution saturée de phénol pendant quinze minutes, puis après ce délai, 1 cm<sup>3</sup> d'anéthol. A ce moment, l'épreuve au tellurite de potassium montre que les bacilles sont déjà morts et on ne constate pas, dans ces conditions, de modification appréciable des cultures ainsi traitées.

Nous avons également mis en suspension directe dans la solution de phénol une culture bacillaire : après une heure de contact les bacilles ainsi dénaturés et morts furent introduits dans l'anéthol et portés à l'étuve à 37°. On constate dans ces conditions que les bacilles restent entièrement acido-résistants pendant les premiers jours et qu'ils commencent à devenir moins acido-résistants après le dixième jour, sans perdre toutefois complètement l'acido-résistance, même après cinq semaines d'observation.

Cependant la suspension dénaturée par le phénol change d'aspect et devient jaune transparent au contact de l'anéthol, comme il avait été constaté pour la suspension de bacilles tués à l'autoclavage.

En outre, si nous déposons un voile de bacilles dans l'eugénol et que nous le laissons pendant quelques semaines à l'étuve (quatre à cinq semaines), nous constatons que la pellicule se dissout partiellement, et que l'eugénol devient plus foncé. La pellicule devient particulièrement dure et les bacilles apparaissent au microscope comme partiellement granulés et fortement acido-résistants.

#### DISCUSSION.

On ne peut qu'être frappé de la différence d'action oléolytique des huiles essayées en fonction de leur composition chimique. Les huiles du groupe phénolique, qui dénaturent les protéines, ne donnent pratiquement pas d'oléolyse, tandis que les huiles sans groupement phénolique, qui n'attaquent pas apparemment les protéines, déterminent une oléolyse rapide. La rapidité de celle-ci indique qu'elle est initialement de nature physico-chimique. L'autolyse fermentaire ne se produirait qu'ensuite.

Une action physico-chimique aussi immédiate paraît n'appartenir qu'aux huiles actives, pouvant pénétrer à l'intérieur du

corps bacillaire. Elle se déduit directement du fait que l'anéthol au titre d'éther phénolique est un solvant organique. Par contre, avec une fonction phénol non estérifiée, l'eugénol et le gaïacol — qui sont également des éthers phénoliques — n'ont pas la même action parce qu'ils provoquent, comme nous l'avons vu, une dénaturation qui empêche l'effet oléolytique.

En effet, si l'on procède à cette dénaturation des protéines bacillaires, par autoclavage des cultures bacillaires ou par le phénol, on constate que la lyse ne se produit pas avec l'anéthol.

Si l'on suppose que l'eugénol et le gaïacol tuent les bacilles en dénaturant les protéines et les ferments, mais sans provoquer de lyse bacillaire, il serait logique d'admettre que l'oléolyse n'est peut-être pas due à une simple action fermentaire. Etant donné, d'autre part, la rapidité avec laquelle l'anéthol fait perdre l'acido-résistance aux bacilles tuberculeux morts ou vivants, on peut se demander si l'existence d'une action oléolytique n'est pas liée à l'état physico-chimique des protéines des corps microbiens.

Il ressort de ce comportement différent, vis-à-vis du bacille tuberculeux, de deux substances telles que l'eugénol-gaïacol et l'anéthol, qu'une oléolyse proprement dite, n'est possible que si les protéines du bacille de Koch restent intactes. C'est le cas de l'anéthol qui, à l'opposé de l'eugénol, ne possède pas de fonction phénol, ne dénature pas les protéines et provoque une oléolyse très rapide.

La dénaturation des protéines bacillaires déterminée par l'eugénol serait analogue à la fixation des protéines cellulaires par le formol, l'acide picrique, etc., telle qu'on la voit se produire dans le traitement habituellement pratiqué des tissus par le formol ou l'acide picrique pour fixer les coupes histologiques.

Cette dénaturation empêcherait l'action des huiles sur les bacilles tuberculeux, très vraisemblablement en diminuant la perméabilité des couches superficielles des cellules bacillaires pour les huiles, et, de ce fait, les cultures conserveraient leur aspect macroscopique normal. Au point de vue microscopique, on observe dans ce cas ainsi que nous l'avons déjà dit, une perte d'acido-résistance partielle, très lente à se produire.

D'ailleurs, en dehors de l'anéthol, d'autres huiles chimiquement inertes, telles que l'huile de paraffine, ont la propriété de lyser les bacilles tuberculeux, ainsi que l'ont montré N. Choucroun [4], R. Laporte et J. Bretey [5] et J. Solomidès [4].

Cette lyse semble s'accompagner de solubilisation de substances bacillaires dans l'huile de paraffine (dont l'acide mycolique et certaines protéines).

Nous pouvons donc conclure que le pouvoir oléolytique des huiles est étroitement lié à leur action physico-chimique. Il n'est pas nécessaire, pour expliquer cette propriété oléolytique, de

faire intervenir l'action d'un ferment lipasique présent dans les bacilles vivants, ainsi que l'ont admis J. Solomidès [4] et Mc Junkin [6].

Cependant, nous ne pouvons pas exclure une action autofermentative, secondaire. En effet, Dubos [7] admet que l'action des solvants organiques facilite le processus autofermentaire et, d'autre part, Laporte [8] a montré que les mêmes solvants n'arrêtent pas le processus autolytique à l'intérieur du bacille tuberculeux. Si tel est le cas, nous pourrions parler d'une oléololyse.

Nous voulons, cependant, insister sur le rôle prépondérant du facteur physico-chimique sur lequel J. Solomidès a déjà insisté à maintes reprises.

\*  
\* \*

Le fait que dans nos expériences, l'action physico-chimique des huiles à fonction phénolique (eugénol-gaïacol) sur le bacille tuberculeux, conserve à celui-ci son acido-résistance, indique que les substances responsables de l'acido-résistance sont en liaison avec les substances protidiques du corps bacillaire. On peut concevoir que la fonction phénol agissant en surface sur les protéines lipophiles, détermine la dénaturation de celles-ci : de ce fait, les liaisons de ces substances avec celles qui sont responsables de l'acido-résistance deviendraient plus solides et la propriété acido-résistante du bacille serait ainsi conservée. Dans le cas des autres huiles, les complexes lipido-protidiques non dénaturés se dissocieraient facilement et il en résulterait une lyse bacillaire.

#### CONCLUSION.

Les huiles à fonction phénolique libre, telles que : eugénol-gaïacol, qui dénaturent les protéines lipophiles du bacille de Koch, ne produisent pas de lyse bacillaire, lorsqu'elles sont mises en contact avec des cultures de bacille de Koch sur pomme de terre ou avec des suspensions bacillaires faites directement dans l'huile ; par contre, l'anéthol qui ne possède pas cette fonction phénolique provoque dans les mêmes conditions une lyse bacillaire très rapide. Celle-ci ne se produit pas, si les cultures bacillaires sur pomme de terre ont été préalablement tuées par la chaleur ou par le phénol. Si les bacilles ainsi traités sont mis en suspension directe dans l'anéthol, on observe une lyse partielle et très lente.

Il semble donc qu'une dénaturation des protéines bacillaires suffit à contrecarrer l'action lytique des huiles.

Ces faits semblent indiquer que l'action physico-chimique des huiles joue un rôle prépondérant dans la production de l'oléo-



lyse bacillaire. Cependant, on ne peut pas conclure à une action auto-fermentaire secondaire. Le fait que l'acido-résistance soit conservée après l'action de l'eugénol sur les protéines, indique qu'il existe à l'intérieur du corps bacillaire des liaisons très importantes entre les substances responsables de l'acido-résistance et les protéines.

Je tiens à exprimer à M. Bretey, chef de service à l'Institut Pasteur, mes bien sincères remerciements pour les possibilités qu'il m'a données de travailler dans son service, et à MM. van Deinse et J. Solomidès pour l'aide qu'ils m'ont apportée pendant mes travaux dans leur laboratoire.

Je voudrais exprimer à M. le professeur Kourilský mes remerciements les plus vifs pour la participation qu'il a prise à la rédaction de ce travail.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] SOLOMIDÈS (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 590 ; *ibid.*, 1945, **139**, 544, et 1946, **140**, 11 ; *Rev. Tub.*, 1945, **9**, 211 ; ces *Annales*, 1946, **72**, 156.
- [2] MUDD (S. et E.). *J. exp. Med.*, 1924, **40**, 633 et 647.
- [3] SULA (L.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **3**, 241.
- [4] CHOUCROUN (N.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **3**, 203.
- [5] LAPORTE (R.) et BRETEY (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 169.
- [6] MC JUNKIN (F. A.). *Am. Rev. Tub.*, 1924, **9**, 464.
- [7] DUBOS (R.). *The bacterial Cell. Harvard University Press*, 1947, 95, 281.
- [8] LAPORTE (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1942, **214**, 887.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

Séance du 1<sup>er</sup> juillet 1948.

---

## COMMUNICATIONS (SUITE)

### ASPECT AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE DES INCLUSIONS DE LA VARIOLE AVIAIRE (CROPS DE BOLLINGER)

par P. LÉPINE, P. ATANASIU et O. CROISSANT.

On admet unanimement aujourd'hui que le virus de la variole aviaire, comme celui des autres varioles, est représenté par les formations granulaires auxquelles Paschen (1) a donné le nom de *corps élémentaires*, que Borrel (2) avait déjà vues dans les lésions cutanées de la variole aviaire traitées par la méthode de coloration de Loeffler et dont il affirma par la suite (3) qu'elles représentaient bien l'agent étiologique de la maladie.

Ces corps élémentaires sont faciles à mettre en évidence dans les tissus et, récemment, Boswell (4) en a donné de bonnes micrographies électroniques.

Mais on observe aussi, dans le protoplasma des cellules épithéliales infectées, de grosses inclusions particulières connues sous le nom de corps de Bollinger en l'honneur de celui qui, en 1875 (5), en a fait la première description, et qui sont comparables aux autres inclusions protoplasmiques rencontrées dans les différentes varioles, inclusions dont le corps de Guarnieri pour la vaccine est le type. On a discuté sur le rapport de ces larges inclusions protoplasmiques avec les fines granulations arrondies et régulières que constituent les corps élémentaires.

Woodruff et Goodpasture (6), M<sup>lle</sup> Baumgartner (7) ont montré, en

(1) E. PASCHEN, *Münch. med. Wochenschr.*, 1906, 53, 2391.

(2) BORREL, *C. R. Soc. Biol.*, 1904, 56, 642.

(3) BORREL, *C. R. Soc. Biol.*, 1909, 67, 774.

(4) BOSWELL, *Brit. J. exp. Path.*, 1947, 23, 253.

(5) BOLLINGER, *Virchow's Archiv*, 1875, 58, 349.

(6) WOODRUFF et GOODPASTURE, *Am. J. Path.*, 1929, 5, 1; *id.*, *ibid.*, 1930, 6, 713.

(7) BAUMGARTNER, *Zentralbl. Bakt.*, 1935, 133, 282.

intervenant sur des corps de Bollinger isolés par micro-dissection, que ces derniers étaient virulents, même inoculés à l'état d'unité. Goodpasture (8) a réussi, après digestion trypsique, à en extraire des corps élémentaires, ce qui montre que du virus, sous forme d'inclusion élémentaire, est contenu dans les corps de Bollinger.

Au cours de recherches sur le virus de la variole aviaire et l'action sur ce dernier de différents enzymes, nous avons pu isoler des corps de Bollinger. Le matériel est cultivé sur membrane chorio-allantoïde, prélevé suivant la technique décrite par l'un de nous (9). Nous avons ainsi repéré une inclusion de Bollinger qui, après montage sur le porte-objet du microscope électronique, a été soumise à l'action de venin

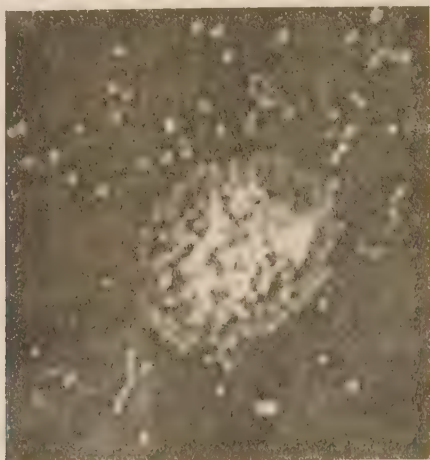


FIG. 1. — Aspect d'un corps de Bollinger au microscope électronique, après attaque partielle par le venin de Daboia. On remarque la similitude d'aspect et de taille des corpuscules dont l'agglomération constitue le corps de Bollinger avec celui des corps élémentaires dispersés dans la préparation. (Microscope électronique C. S. F., tension 45 kv., grossissement 7.000).

de Daboia (*Vipera russellii*). Le venin est dilué à 5 p. 1.000 dans l'eau physiologique à pH 7 et mis en contact avec l'inclusion pendant trente minutes à la température de l'étuve\*.

La figure 1 montre l'aspect de l'inclusion ainsi traitée. Elle apparaît sous la forme d'une masse ronde dont les contours sont entamés et qui est bourrée de corpuscules d'une taille uniforme ayant le même aspect général que les corps élémentaires épars dans le reste de la préparation. L'aspect de l'inclusion partiellement attaquée par le venin montre qu'au sein de l'inclusion, les corps élémentaires très nombreux

(8) GOODPASTURE, *Science*, 1933, **77**, 119.

(9) P. ATANASIU, ces *Annales*, 1948, **74**, 418.

(\*) Nous adressons tous nos remerciements à M. Paul Boquet qui nous a obligeamment procuré le venin de Daboia servant à nos expériences.

et groupés en masse, sont enrobés dans une gangue dont la trace est nettement perceptible et qui, par endroits, masque encore les corpuscules.

Toute proportion gardée, l'analogie est grande avec les images électroniques des corps de Guarnieri obtenus sur cultures de tissu rénal, examinés au microscope électronique par Wirth, Atanasiu, Barski et Croissant (10) dans lesquelles il a été observé des corpuscules élémentaires en nombre variant d'un seul à une vingtaine par inclusion.

Dans le cas de la variole aviaire, l'inclusion du corps de Bollinger est formée de l'agglomération, par le même mécanisme, mais d'un nombre beaucoup plus élevé, des corps élémentaires du virus.

CONCLUSION. — L'examen au microscope électronique confirme la conception de Borrel suivant laquelle les inclusions de la variole aviaire sont formées par l'accumulation d'un nombre élevé de corps élémentaires du virus. L'étude des corps de Bollinger attaqués partiellement par le venin de Daboïa permet d'en préciser la constitution et la morphologie.

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

## VARIANTE DE LA MÉTHODE DE MACCHIAVELLO APPLICABLE A LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE (VIRUS DE LA MALADIE DE NICOLAS ET FAVRE)

par J. C. LEVADITI, P. LÉPINE, L. REINIÉ et P. ATANASIU

Les excellents résultats obtenus à l'aide de la méthode de Macchiavello par Giroud et Panthier pour les rickettsies (1), par Rake et Jones (2) pour les virus du groupe psittacose, ornithose, lymphogranulomatose vénérienne, par Panthier, Cateigne et Hannoun (3) pour le virus grippal, nous ont incités à établir une variante de cette méthode destinée à la microscopie en fluorescence.

TECHNIQUE. — Des frottis sont préparés à partir de sacs vitellins d'œufs de poule en incubation inoculés depuis six jours suivant la technique de Rake avec du virus lymphogranulomateux (souche Kam ou souche Rake). La présence de virus est affirmée par la constatation d'un grand nombre de granulo-corpuscules de Miyagawa colorés par la méthode de Macchiavello type, puis par passage du virus sur sac vitellin et, enfin, par les propriétés antigéniques spécifiques des membranes (réaction de Frei).

(10) J. WIRTH, P. ATANASIU, G. BARSKI et O. CROISSANT, *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 827.

(1) P. GIROUD et R. PANTHIER, *C. R. Acad. Sci.*, 1941, **212**, 253 et **213**, 45.

(2) G. RAKE et H. JONES, *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 323.

(3) R. PANTHIER, G. CATEIGNE et C. HANNOUN, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 691 et ces *Annales*, 1948 (sous presse).



Les fluorochromes essayés sont l'Eosine G, l'Auramine B, l'Orangé d'Acridine, la Thioflavine S, la Thioflavine T, en solutions à 2 p. 1.000, concentration utilisée pour la coloration simple de frottis. De tous ces fluorochromes, la Thioflavine T convient le mieux à cette coloration.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS. — Préparer :

Thioflavine T en solution à 2 p. 1.000 dans l'eau distillée. Cette solution doit être conservée à la glacière et utilisée pendant la semaine qui suit sa préparation. Après ce délai, elle est impropre à la coloration. La filtrer au moment de l'emploi.

Bleu de méthylène en solution à 1 p. 100 dans l'eau distillée. Cette solution se conserve indéfiniment.

Acide citrique en solution à 10 p. 100 dans l'eau distillée. Conserver à la glacière. Diluer au moment de l'emploi à raison de 5 cm<sup>3</sup> dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau bidistillée ou d'eau distillée fraîchement bouillie (pH 2).

COLORATION. — 1° Sur le frottis sec, mais non fixé, verser la Thioflavine T. Laisser en contact quinze minutes ou plus.

2° Eliminer le colorant par l'acide citrique dilué pour différencier (trois secondes).

3° Laver rapidement à l'eau distillée.

4° Verser immédiatement la solution de bleu de méthylène diluée à 1 pour 6 dans l'eau distillée (trois secondes).

5° Sécher de suite avec papier filtre.

Examiner au microscope en fluorescence, soit avec un objectif 60 à sec, soit avec un objectif à immersion utilisant une huile de cèdre non fluorescente.

RÉSULTAT. — Examinée avant toute coloration, la préparation n'est pas dépourvue de toute fluorescence primaire, certaines cellules étant douées d'une fluorescence bleu pâle. D'autres formations arrondies absorbent le rayonnement ultra-violet et apparaissent en noir sur le fond violet du champ microscopique ; elles correspondent à des sphérules de lipides, comme le démontrent les frottis colorés au rouge écarlate.

En fluorescence, le bleu de méthylène obscurcit le fond de la préparation, il laisse aux cellules, et surtout aux noyaux, leur fluorescence bleue. Cette teinte tranche parfaitement avec les granulo-corpuscules du virus lymphogranulomateux, qui sont doués d'une fluorescence jaune orangé.

Sur les préparations témoins, faites avec des sacs vitellins normaux de même âge, on ne constate aucune granulation de ce type.

D'autres préparations témoins sont faites avec des calques de pustules de variole aviaire (crête et barbillons de coq) extrêmement riches en corps élémentaires. Ces corps élémentaires rendus fluorescents par la Thioflavine, perdent toute fluorescence sous l'influence de l'acide citrique. Il y a donc là un comportement différent des granulo-corpuscules du virus lymphogranulomateux et des corps élémentaires de la variole aviaire, qui peut trouver une explication dans la différence de diamètre particulière de ces deux virus.

Enfin, au cours de l'examen de la préparation, sous l'influence du

rayonnement ultra-violet, un effet photochimique diminue rapidement la fluorescence des granulo-corpuscules ; après quelques minutes, la lame s'assombrit et s'éteint.

CONCLUSION. — A l'aide de la technique de coloration de Macchiavello, modifiée (thioflavine T en solution étendue à 2 p. 1.000 au lieu de fuchsine basique en solution à 2.5 p. 100), il est possible d'utiliser la microscopie en fluorescence pour la mise en évidence des granulo-corpuscules du virus lymphogranulomateux. Sur les frottis de membranes vitellines, la présence de lipides qui absorbent le rayonnement ultra-violet gêne l'examen de la préparation. Cette technique d'examen est donc possible, mais ses résultats demeurent inférieurs à ceux de la coloration de Macchiavello type examinée à la lumière blanche.

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

## IMMUNITÉ ET ALLERGIE CHEZ LES VÉGÉTAUX

par J. MAGROU, P. MANIGAULT et G. SEVRÉTAÏN.

L'un de nous (1) a montré que les *Pelargonium* porteurs d'une tumeur provoquée par l'inoculation de l'*Agrobacterium* (= *Phytophthora*) *tumefaciens*, agent du cancer des plantes ou « crown-gall », présentent une immunité partielle ou totale à la réinoculation du même germe. Si, à un *Pelargonium* portant une tumeur en pleine évolution, on réinocule l'*A. tumefaciens*, par piqûre d'aiguille, dans chacun des entre-nœuds situés au-dessus (ou au-dessous) de la tumeur, on constate qu'il existe sur la tige, de part et d'autre de ce foyer primaire, une zone étendue où les réinoculations de la bactérie ne provoquent pas la formation de tumeurs nouvelles. C'est seulement au niveau des inoculations les plus éloignées, ou, plus rarement, les plus rapprochées de la galle primitive que, dans 50 p. 100 environ des plantes réinoculées, on voit se développer des tumeurs à croissance lente et qui restent le plus souvent de petite taille. Ces faits peuvent s'expliquer par l'hypothèse d'une substance inhibitrice (anticorps) se développant au niveau du foyer infectieux primaire et diffusant dans la tige, à partir de la tumeur, en se diluant de plus en plus dans les sucres de la plante. Si cette substance n'agit qu'à une concentration optimale, on conçoit que dans les entre-nœuds voisins de la tumeur, elle puisse être trop concentrée pour être efficace ; dans les entre-nœuds les plus éloignés, elle sera trop diluée ; l'action inhibitrice ne se produira que dans une zone intermédiaire comprise entre ces deux points extrêmes. C'est le phénomène de zone, bien connu en immunologie animale.

Il y a plus, et tandis que chez les *Pelargonium* inoculés pour la première fois, aucune réaction appréciable ne se manifeste au niveau des piqûres dans les jours qui suivent l'inoculation (pl. I, fig. 3), chez

(1) J. MAGROU, ces *Annales*, 1938, 60, 565.

les plantes portant une tumeur, la réinoculation donne lieu à une réaction précoce : au bout de deux à quatre jours, les entre-nœuds inoculés sont gonflés, et l'épiderme se déchire au niveau des piqûres, d'où la formation de craquelures fusiformes, longitudinales, pouvant dépasser 1 cm. de long (pl. I, fig. 4). Dans certains cas, autour des piqûres, apparaissent des plaques nécrotiques qui, parfois, deviennent confluentes et aboutissent à la nécrose d'un ou de plusieurs entre-nœuds. D'autres plantes, enfin, se fanent peu de temps après l'inoculation, comme si elles subissaient une intoxication généralisée. Chez les *Pelargonium* atteints de crown-gall, l'immunité vis-à-vis des réinoculations de l'*A. tumefaciens*, se double donc d'un état d'hypersensibilité qui se traduit par des phénomènes d'intoxication locale ou générale.

Le but de cette communication est de présenter de nouvelles expériences qui mettent en évidence, de façon particulièrement intense, ce phénomène d'hypersensibilité aux réinoculations. La planche (fig. 1) montre un *Pelargonium* qui porte une tumeur, résultant de l'inoculation de l'*A. tumefaciens*, faite au début de mars 1948. Le même germe a été inoculé le 10 mai 1948 dans tous les entre-nœuds situés au-dessus et au-dessous de la tumeur. Deux jours après la réinoculation, on voyait, dans les entre-nœuds les plus voisins et les plus éloignés de la tumeur, de longues et profondes craquelures en losange. En même temps, dans la région comprise entre ces deux points extrêmes, les craquelures, de même type, mais beaucoup plus étendues, étaient devenues confluentes, se rejoignant d'un entre-nœud à l'autre, et réalisant une sorte d'éclatement total de la tige. Le phénomène de zone, déjà signalé à propos de l'immunité, se retrouve donc ici dans le cas de l'hypersensibilité.

Les résultats se sont montrés les mêmes chez une autre plante réinoculée seulement au-dessus de la tumeur. Ici encore, on observe le même éclatement longitudinal de la tige et le même phénomène de zone (pl. I, fig. 2). Actuellement (1<sup>er</sup> juillet 1948), chez ces deux plantes, de minimes excroissances, à développement lent, apparaissent au niveau des craquelures de la tige les plus éloignées ou les plus rapprochées de la tumeur primitive, ce qui confirme les constatations antérieures.

Ces faits, qui offrent, avec les phénomènes d'allergie communs dans le règne animal, une analogie frappante, nous paraissent relever de l'hypothèse invoquée plus haut pour expliquer l'immunité aux réinoculations. L'immunité et l'hypersensibilité (ou allergie) représentent deux aspects, souvent concomitants, d'un même processus. Appliquant l'hypothèse que Maurice Nicolle avait déduite de ses expériences de réinoculation chez les animaux, on est amené à attribuer l'immunité des *Pelargonium* infectés par l'*Agrobacterium tumefaciens* à un anticorps spécifique qui, lors de l'inoculation d'épreuve, se fixe sur l'antigène. Les électrolytes ambiants coagulent le complexe ainsi formé (actions agglutinantes et précipitantes, déjà mises en évidence dans le crown-gall) (2). La décoagulation du complexe (action lytique) se produit ensuite ; elle a pour effet de détruire l'antigène et, par là, d'assurer l'immunité. Mais elle s'accompagne de libération de produits

(2) J. MAGROU, *Loc. cit.*







toxiques dissimulés au sein de l'antigène et qui provoquent les accidents d'intoxication locale ou générale observés chez la plupart des plantes immunisées.

D'autres expériences montrent que l'immunité ne se limite pas forcément au rameau porteur de la tumeur, mais peut s'étendre aux branches qui en sont issues.

Ces faits révèlent un parallélisme saisissant entre les processus de l'immunité chez les plantes et chez les animaux et suggèrent que ces processus doivent relever, dans l'un et l'autre règne, d'un seul et même mécanisme.

(Institut Pasteur.)

### LÉGENDE DE LA PLANCHE HORS-TEXTE

FIG. 1. — Première inoculation, début mars 1948, réinoculation le 10 mai 1948 dans tous les entre-nœuds au-dessus et au-dessous de la tumeur. Photographie faite le 5 juin 1948. On remarquera que la réaction est moins vive et moins étendue aux deux extrémités de la tige les plus éloignées de la tumeur principale.

FIG. 2. — Première inoculation début mars 1948, réinoculation le 10 mai 1948 dans tous les entre-nœuds au-dessus de la tumeur primitive. Photographie faite le 5 juin 1948. On voit que la région la plus proche de la tumeur primitive et la région la plus éloignée (extrémité supérieure de la tige) sont celles où les réactions sont le moins vives.

FIG. 3. — Plante témoin inoculée une seule fois le 9 juin 1948 dans l'avant-dernier entre-nœud. Photographie faite le 20 juin 1948.

FIG. 4. — Plante comparable à celle de la figure 3, ayant subi une première inoculation le 11 décembre 1947, une seconde inoculation le 9 juin 1948 dans l'avant-dernier entre-nœud avec la même culture que celle qui a servi à l'inoculation de la plante de la figure 3. Photographie faite le 20 juin 1948. La réaction de cette plante est plus précoce, et beaucoup plus vive que celle présentée par la plante de la figure 3. (Clichés Manigault.)

## INFECTIONS ASSOCIÉES EXPÉRIMENTALES DU PELARGONIUM

par B. RYBAK.

L'étude des infections associées expérimentales a déjà donné des résultats intéressants en pathologie animale ; l'infection étant une des formes de l'antibiose, nous avons pensé qu'il serait instructif de mettre en compétition *in vivo* deux bactéries dépourvues d'antagonisme réciproque, mais dont les caractères pathogènes sont directement opposés. Nous avons pour cela utilisé une bactérie responsable de proliférations cellulaires [*Phytoponas tumefaciens*, variété « 42-4 » (1), agent du

(1) Dans le texte « 42/4 ».

crown-gall] et une bactérie qui, au contraire, détruit les cellules [*Erwinia carotovora* (2), agent d'une pourriture humide de la carotte, également pathogène pour *Pelargonium zonale*, plante que nous avons employée dans nos expériences].

Nous avons d'abord constaté en tubes de culture à base de gélose nutritive ordinaire, qu'il n'y avait pas d'antagonisme direct entre « 42/4 » et « E. c. ». Puis, dans une première série d'expériences, nous avons inoculé ces bactéries dans les derniers ou avant-derniers entrenœuds de *Pelargonium* de dix mois, soit en effectuant des infestations dans les mêmes points et à la suite de « 42/4 » puis de « E. c. »



FIG. 1. — Inoculations mixtes « 42/4 » — « E. c. ». Tumeur avec nécrose sèche partielle dans la région a (atmosphère de degré hygrométrique 36-38).

ou inversement, soit en effectuant préalablement et aseptiquement sur lame le mélange de ces bactéries à l'aide de l'aiguille d'inoculation. Les plantes étaient cultivées dans la serre de l'Institut Pasteur à 20° C ; degré hygrométrique : 36-38.

Après deux mois, les plantes inoculées par l'ensemble « 42/4 » « E. c. » présentaient des tumeurs avec nécroses sèches partielles (fig. 1, région a). Les témoins « 42/4 » montraient des tumeurs normales (développement en « choux-fleurs » sans nécrose). Les témoins « E. c. » présentaient des éclatements fusiformes secs marquant les points d'inoculation.

Le degré hygrométrique trop bas était responsable de l'absence de

(2) Dans le texte « E. c. ».

pourriture humide chez les témoins « E. c. » ; c'est pourquoi nous avons entrepris une seconde série d'expériences en employant les mêmes modes d'inoculation que précédemment, mais en cultivant les plantes en atmosphère saturée d'eau. On réalisait cette humidité en plaçant des pulvérisateurs pneumatiques à 0,75 m. environ du sommet des plantes utilisées (pulvérisations poursuivies nuit et jour). Dans ces conditions, après dix jours, les résultats ont été les suivants (3) :

a) Dans les infections les plus sévères, la région environnant les points d'inoculation de l'ensemble « 42/4 »-« E. c. » présente une forte pourriture humide avec rupture presque totale de la tige (fig. 2) ;

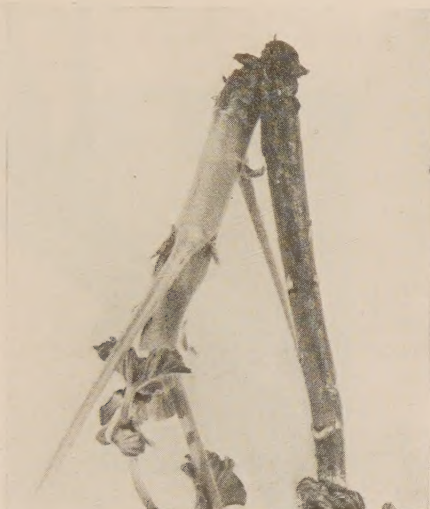


FIG. 2. — Inoculations mixtes « 42/4 » — « E. c. ». Infection sévère : pourriture humide (atmosphère saturée d'eau).

b) Dans les cas bénins (les plus fréquents), on note seulement des nécroses fusiformes humides avec forts éclatements dans l'épaisseur de la tige (fig. 3 ; les hypertrophies que l'on remarque sur ce cliché paraissent dues à l'écartement des traumatismes ; aucune formation de tumeurs après un mois) ;

c) Les témoins « E. c. » montrent aussi des nécroses humides d'importance variable ;

d) Les témoins « 42/4 » n'ont parfois donné lieu à aucun début de tumeur après trente-cinq jours, mais, dans la grande majorité des cas, on obtenait des tumorisations à réactions remarquables.

On sait que, très souvent, l'inoculation de *Phylomonas tumefaciens* au *Pelargonium zonale* produit rapidement, aux points d'inoculation,

(3) Notons tout d'abord que les *Pelargonium* ainsi traités présentent parfois une chlorose plus ou moins accentuée.



des éclatements fusiformes affectant l'épiderme et les tissus plus profonds ; dans une note antérieure [1], nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'une action liée à la diffusion longitudinale de « toxines » bactériennes, suivie de déshydratation et finalement de la formation d'un sillon par tension tangentielle s'exerçant sur les lèvres du traumatisme. Cette conception se trouve confirmée d'une part par certains des résultats exposés ci-dessus (témoins « E. c. » cultivés en humidité insuffisante, et d'autre part par nos expériences effectuées en inoculant *Phytomonas tumefaciens* enrobé dans de la vaseline [2]. De plus, nos témoins « 42/4 » en atmosphère saturée d'humidité



FIG. 3. — Inoculations mixtes « 42/4 » — « E. c. » Infection bénigne. Pourriture localisée aux points d'inoculations (atmosphère saturée d'eau).

dilé n'ont jamais présenté de tumorisations avec éclatements polaires longitudinaux (fig. 4) ; on peut, tout au plus, noter, et cela rarement, comme d'ailleurs dans certains cas d'inoculation de « 42/4 » enrobé dans de la vaseline, des déchirures n'affectant que l'épiderme. Tous ces faits confirment nettement le rôle de la déshydratation dans les accidents annexes qui suivent les inoculations de bactéries pathogènes au *Pelargonium*.

Enfin, si on isole les plantes inoculées par « E. c. »-« 42/4 » présentant des réactions bénignes de nécrose humide et qu'on les place en atmosphère de degré hygrométrique convenable (de l'ordre de 45), on obtient, après un mois, des tumeurs d'aspect tout à fait normal. Ce résultat indique que :

1° « 42/4 » n'a été sensible ni à « E. c. » (ce qui est conforme

à l'étude *in vitro*), ni aux produits libérés par les tissus nécrosés sous l'influence de « E. c. » ;

2° dans une certaine mesure, l'intégrité des tissus de l'hôte peut être altérée partiellement sans que la tumorigénèse ultérieure soit affectée. Cependant, même en considérant que « 42/4 » migre dans les tissus — d'après les résultats classiques de Ben Hill [3] — échappant ainsi à l'action nocive que pourraient avoir sur lui les produits de la nécrose humide, il reste à expliquer pourquoi la tumorigénèse n'a pu parfois se produire dans les conditions de nécrose humide bénigne.

CONCLUSIONS. — De ces faits ressort, en premier lieu, le rôle décisif des facteurs environnants dans les infections des végétaux ; pour ce qui a trait plus spécialement aux pourritures, le rôle de l'humidité

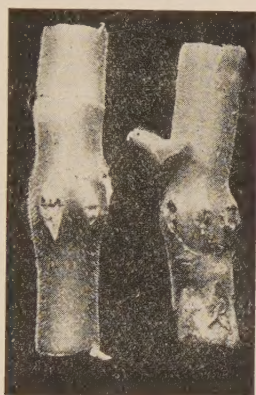


FIG. 4. — Inoculations de vingt jours avec « 42/4 ». A droite : début de tumorigénèse en atmosphère saturée d'eau ; on remarque l'absence d'éclatements fusiformes. A gauche : début de tumorigénèse en atmosphère de degré hygrométrique voisin de 45 ; présence de fuseaux d'éclatement.

est connu depuis fort longtemps ; or, Ark [4], s'inspirant sans doute des découvertes d'Arciszewski et Kopakzewski [5], a pu obtenir la résorption des tumeurs à *P. tumefaciens* du *Pelargonium* (tumeurs âgées d'un mois) en leur inoculant *Erwinia carotovora*. Cependant, cet auteur n'indique pas les conditions d'humidité et, de plus, il signale que :

1° cette disparition des tumeurs n'est suivie d'aucune récurrence tumorale après un an ;

2° l'inoculation de « E. c. » à des *Pelargonium* sains n'affecte pas ces plantes.

Or, de deux choses l'une : ou bien les conditions d'humidité propices au développement d'une pourriture étaient réalisées et, dans ce cas, les résultats des inoculations de « E. c. » aux *Pelargonium* sains ne s'expliquent pas, ou bien l'humidité était insuffisante et on ne pouvait

obtenir qu'une nécrose sèche, peu ou pas expansive des tiges saines et des tumeurs, et nous avons vu que la présence conjointe de « E. c. » et de 42/4 » à l'inoculation ne gêne pas sensiblement la tumorigénèse. D'ailleurs, en ce qui concerne la deuxième partie de cette publication de Ark, relative à l'action antitumorale de certains enzymes et de certains amino-acides, remarquons que Paluch [6] n'a pu confirmer les résultats dont elle fait état.

(Service de Physiologie végétale et de Mycologie  
de l'Institut Pasteur de Paris.)

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] RYBAK. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 1462.
- [2] RYBAK. *Rev. Path. vég. et Ent. agr.* (sous presse).
- [3] BEN HILL. *Phytopath.* 1928, **18**, 553.
- [4] ARK. *Science*, 1937, **85**, 364.
- [5] ARCISZEWSKI et KOPACZEWSKI. *C. R. Acad. Sci.*, 1928, **186**, 1157.
- [6] PALUCH. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 1938, **15**, 37.

---

#### AVIS

---

Le Centre National de la Recherche Scientifique organise un enseignement théorique et pratique sur l'emploi des corps marqués par isotopes radio-actifs dans les études biologiques. Cet enseignement sera donné à Paris, au cours du second semestre de l'année universitaire 1948-1949. Il est destiné à des chercheurs déjà qualifiés par leurs études antérieures.

Les personnes désirant y prendre part devront envoyer leur demande, accompagnée de leurs titres et travaux, avant le 1<sup>er</sup> novembre, à M. Terroine, Centre National de la Recherche Scientifique, 13, quai Anatole-France, Paris (7<sup>e</sup>).

---

Le Gérant : G. MASSON.